

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



**ANÁLISIS GENÉTICO DE GENES MAYORES DE  
PREDISPOSICIÓN Y GENES DE BAJA PENETRANCIA EN  
EL CÁNCER COLORRECTAL ESPORÁDICO.**

**TESIS DOCTORAL**

**NARGISSE NEJDA HAMDOUN**



**MADRID 2010**



**D. Juan José González-Aguilera**, Catedrático de Genética de la Universidad Autónoma de Madrid y **Dña. Antonia Maria Fernández-Peralta**, Profesora Titular de Genética de la Universidad Autónoma de Madrid, certifican que **Dña. Nargisse Nejda Hamdoun** ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral titulado: “**Análisis genético de genes mayores de predisposición y genes de baja penetrancia en el cáncer colorrectal esporádico**”.

Revisado el presente trabajo, consideran que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Dr. D. Juan José González-Aguilera

Dra. Dña. Antonia Maria Fernández-Peralta



*« Reste devant la porte si tu veux qu'on te l'ouvre. Ne quitte pas la voie si tu veux qu'on te guide. Rien n'est fermé jamais, sinon à tes propres yeux. »*

*Farid al-Din Attar.*



*À ma mère qui m'a enseigné à lire et écrire,  
À mon père qui m'a enseigné à étudier.*

*À ma Sofi,  
À ma Yaya*

*À ma petite famille.*





# *AGRADECIMIENTOS*



## AGRADECIMIENTOS

*¡Agradezco mucho que haya llegado por fin el momento de agradecer!*

*Pensé que nunca llegaría, o simplemente que no lo haría...Pero todo llega en esta vida y, creo que ha llegado el momento...!!! Así que ahora y, llegando a este punto, no puedo hacer otra cosa sino mirar atrás y intentar acordarme de toda la gente que me ha acompañado, enseñado, ayudado y sobre todo marcado a lo largo de estos años y intentar expresar mi gratitud hacia todos ellos. Así que, y como es costumbre, empezaré por agradecer a mis directores de tesis:*

*Al Dr. Juan José González-Aguilera y la Dra. Antonia María Fernández-Peralta, por ofrecerme la oportunidad de aprender lo que más me gustaba. Por enseñarme cuánto sé de Genética y de cáncer e iniciarme en la docencia. Por adentrarme en el mundo de la investigación y enseñármelo tal como es.*

*Nuestros logros y éxitos se deben en gran parte a las personas que tenemos alrededor, y en este sentido me siento muy afortunada porque me siento rodeada de las mejores personas que puede haber y además en dos países distintos, y esa es otra suerte...*

*En estos años, he convivido con muchas generaciones en el laboratorio: Marta, a quién he sido adjudicada al principio y quién me enseñó mis primeros pasos en el A-205. Ruth, quién me inició en las fiestas madrileñas y en los paseos por el centro de Madrid. Javier, con quién he compartido algunas tardes en el laboratorio y algunas clases de idiomas. Cristina, Sara, Jana, Graciela, Álvaro, Pablo, Nacho, Marián, Paloma...A todos gracias! Y también al último compañero en esta lucha: Dani, por nuestro “matrimonio de 15 años”, por nuestras peleas cariñosas y por aguantar mi música, aunque sé que en el fondo te gusta pero no lo quieres reconocer...*

*A mis compañeros de los cursos de doctorado: María, por dejarme los apuntes, en los tiempos en que mi castellano provocaba la risa. A Conchi (SIDI), por nuestros cafés contándose nuestras vidas. Verónica, Taís, Lola, Alicia y Alfonso...Gracias chicos, lo he pasado en grande con vosotros!*

*A lo largo de estos años, he ido conociendo a mucha gente y, muchos de ellos acabaron convirtiéndose en mis mejores amigos:*

*\* El club “Vips”, o el cariñosamente llamado “la facción A”, empezando con Conchi, quién me integró en éste. Creo que necesito varias páginas para contar todo lo que has hecho por mí, y aún así me olvidaré de muchas cosas... Parece que fue ayer cuando empecé a comer contigo porque me había quedado sola en el laboratorio, y gracias a ello he vivido lo mejor en Biológicas y fuera de ella. Gracias por contestar a mis dudas, por hablarme de enzimas de*

*restricción y de Van Gogh. Por tener la paciencia de escucharme siempre que necesitaba hablar y por secar mis lágrimas todas las veces que se me caían. Por tener que convencerme tantas veces de no tirar la toalla y de seguir adelante a pesar de todo. Gracias tía, sé que has sufrido conmigo...!!!*

*Montse, la segunda vecina y gran amiga. Gracias por ser tan buena persona ayudándome todas las veces que pedía tu ayuda. Por solucionarme los problemas informáticos y aclararme las dudas de inglés. Por escuchar mis quejas y tranquilizarme todas las veces que pierdo la calma asegurándome que todo saldrá bien...*

*Vicky y Virginia, sois únicas...Gracias por vuestra amistad y cariño. Por animarme continuamente y por pasarlo tan bien con vosotras.*

*Nuestros encuentros “Vips” son inolvidables...*

- \* Cédric, gracias por ser un gran amigo. Por apoyarme en mis propósitos más extravagantes y acudir a mí ayuda cada vez que lo necesitaba.*
- \* Raquel y Julio, seguramente ni os vais a enterar de estas líneas que os dedico. Sin embargo, sé que os debo mucho y que habéis hecho mucho por mí. Gracias por todo, no os olvido...*
- \* Lidia e Iván, Merce, Nadia y Carlos, Youness y Maïssoune, Moustafa, Nerea, Rodolfo, Cristina, Zahra... Conoceros y vuestra amistad significan mucho por mí. Simplemente gracias!!*
- \* A mis vecinos y amigos de citología: Paloma, Ana, Óscar, José, Vero, Laura, Santi, Ester...Gracias por vuestra amistad, ayuda y ánimos y, por hacerme participe de los encuentros fuera de la UAM, en, como diría la hija de José, “las fiestas de patas”. Lo paso genial con vosotros...!*
- \* El gran Antonio Talavera, en todos los aspectos menos el físico! Gracias por permitirme ser tu amiga. Por hacer de cada uno de nuestros encuentros culinarios un evento único. Por hacernos viajar a través del mundo estando sentados en las mesas de la cafetería de Biológicas. Por hablarnos de ciencia, historia, etimología, arte y música y, por hacerme recordar reglas de gramática y conjugación en árabe que ni me acordaba que existían...Eres un amigo excepcional.*
- \* Emilio y Domínica. Gracias, por hacer parte de mi nueva familia en España. Por tratarme como una hija más y como una gran amiga. Por interesarse siempre por mi salud cuando estoy mala, así como por la tesis en los grandes momentos de desesperación.*

*Por otra parte, me gustaría dar las gracias al departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid por brindarme la ocasión de formar parte del personal de esta institución y tener la oportunidad de impartir clases de lo que me más gustaba en un idioma que nunca había pensado que podría algún día hablar...*

*No olvidaré tampoco de dar las gracias a Pilar Montero y a Carlos Varea por socorrerme en los momentos de desesperación estadística e interesarse siempre por cómo iba con la tesis.*

*La segunda parte de estos agradecimientos está dirigida a los franco-hablantes, mi familia y mis amigos de Meknès, por eso la escribo en francés:*

*Malgré toutes ces années d'absence, j'ai eu la chance de préserver des amis de là d'où je viens, Meknès. C'est vrai que je les vois peu et malheureusement chaque fois moins...Cependant, il n'y a pas un jour qui passe sans me rappeler de chacun d'eux et de tout ce qu'on a vécu ensemble depuis l'école primaire jusqu'à l'étape universitaire. Personnellement, je suis convaincue que ce sont les meilleurs amis qu'on ne peut s'imaginer : Mouna, mon amie de l'enfance. Najate, l'âme sœur. Adra, Zakia, Naima, Nabil, Hassan, Abdel Moughit, Majda, Ibtihaj, Chafika... Merci pour être vous-même et pour faire partie de moi. Merci pour votre amitié...*

*Abd Essamad, mon « petit-frère » et grand ami, tu es une personne tout simplement exceptionnelle. Merci pour m'aimer tant...*

*Maintenant, que le moment est arrivé de remercier mes parents, je crois que je ne trouve pas les mots suffisants pour le faire...Dire simplement «merci » serait très mesquin pour essayer de vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi...Que pourrais-je ne pas remercier ? Il y a trop peu de lignes dans cette thèse pour énumérer tout ce que je vous dois...*

*\* Ma mère. Si je suis entrain d'écrire ces lignes c'est en grande partie grâce à toi. Tu as été la première à m'enseigner à lire et à écrire, à m'encourager tout le temps et à me pousser vers l'avant...Merci pour me faire croire que je suis tellement forte et que je peux franchir tous les obstacles. Merci pour supporter mon absence...*

*\* Mon père. C'est ton français que j'utilise pour essayer de te remercier!! Merci, pour faire de moi la bonne élève disciplinée que j'ai été. Pour m'enseigner à être toujours parmi les premiers et qu'un travail bien fait nous permet de récolter les meilleurs fruits. Pour les années de convivialité madrilène...*

*Merci à vous deux pour faire de moi ce que je suis. Pour me donner toute la liberté et me faire confiance. Pour votre protection, car même à des centaines de kilomètres de vous, quand je prends le téléphone et j'entends votre voix je me sens protégée...*

*Les autres membres de ma petite famille :*

*\* Ma « grande » petite soeur Safae. Merci pour me faire rire même aux pires moments, pour simplifier tellement ce qu'on a tendance à compliquer, pour être l'esprit de la joie de chez nous. Pour être unique...*

*\* Ma grand-mère « Yaya ». Merci pour prier tellement pour moi, pour m'aimer tant et me vénérer tellement. Tout simplement je t'adore...*

*Merci pour me faire sentir la personne la plus chanceuse et la plus heureuse du monde, chaque fois que je reviens à la maison...*

*Et bien sûr, je n'oublierai pas de remercier les autres membres de la famille en commençant par mes tantes « Tati » et « Nanna ». Merci pour vous préoccuper tellement pour moi, pour m'aimer. Pour me rappeler toujours la vieille que je suis, et le pire sans fiancé!! Pour être comme vous êtes, et malgré tout faire partie de moi...*

*Grand-père et oncle Hassan, que Dieu ait leurs âmes, merci pour votre affection et encouragement, et oncle Hassan, pour nos parties de cartes les dimanches après-midi, comme ça me manque...!!*

*Mon oncle « bibi », merci pour ton affection et pour venir spécialement me voir chaque fois que je reviens du voyage. Tu ne peux pas imaginer comme ça me fait plaisir de te revoir à chaque fois...*

*Enfin, merci à tous les autres membres de la famille qui m'ont encouragé et soutenu.*

*Grâce à vous tous j'ai pu réaliser mon rêve.*

*Gracias de corazón.*

*Merci, et surtout merci...*

*INDICE*





## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
1. EL CÁNCER .....	23
2. EL CÁNCER COLORRECTAL .....	26
2.1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD .....	26
2.2. ETIOLOGÍA .....	29
2.3. DIAGNÓSTICO.....	30
2.4. LOCALIZACIÓN DE LOS TUMORES .....	30
2.5. CLASIFICACIÓN.....	32
2.5.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA .....	33
2.5.2. CLASIFICACIÓN CLINICOPATOLÓGICA .....	34
2.6. VÍAS MOLECULARES DE LA TUMOROGÉNESIS COLORRECTAL .....	36
2.6.1. VÍA SUPRESORA Y CIN .....	36
2.6.2. VÍA MUTADORA Y MSI.....	37
2.6.3. VÍA MUTADORA INTERMEDIA .....	40
2.6.4. VÍA SERRADA .....	41
2.7. SÍNDROMES DE CCR DESARROLLADOS A TRAVÉS DE LAS DISTINTAS VÍAS DE CARCINOGENÉISIS.....	42
2.7.1. CCR ESPORÁDICO .....	42
2.7.2. CCR FAMILIAR.....	43
2.7.3. CCR HEREDITARIO .....	43
2.7.3.1. CCR HEREDITARIO POLIPÓSICO.....	44
2.7.3.1.1. POLIPOSIS ADENOMATOSA .....	44
2.7.3.1.2. POLIPOSIS HAMARTOMATOSA .....	45
2.7.3.2. CCR HEREDITARIO NO-POLIPÓSICO .....	46
2.7.3.2.1. SÍNDROME DE LYNCH O HNPCC.....	46
2.8. GENES IMPLICADOS EN LA TUMOROGÉNESIS COLORRECTAL .....	53
2.8.1. VÍA SUPRESORA.....	53
2.8.1.1. <i>APC</i> .....	53
2.8.1.2. <i>CDH1</i> .....	56
2.8.1.3. <i>KRAS2</i> .....	58
2.8.1.4. <i>TP53</i> .....	61
2.8.1.5. <i>DCC</i> .....	63
2.8.2. VÍA MUTADORA.....	64
2.8.2.1. MUTADORES PRIMARIOS.....	64
2.8.2.2. MUTADORES SECUNDARIOS.....	72
2.8.2.2.1. <i>BAX</i> .....	72
2.8.2.2.2. <i>TGFBR2</i> .....	74
2.8.3. METILACIÓN EN EL CÁNCER COLORRECTAL.....	77
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>83</b>

<b>PACIENTES Y MÉTODOS.....</b>	<b>87</b>
1. PACIENTES Y CONTROLES.....	87
2. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO.....	88
3. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES .....	90
4. ANÁLISIS DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD.....	90
5. ANÁLISIS DEL CODON 12 DEL GEN <i>KRAS2</i> .....	93
6. ANÁLISIS DE LOS MUTADORES SECUNDARIOS.....	97
7. PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP).....	98
8. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN <i>MLH1</i> .....	101
9. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO .....	105
10. SECUENCIACIÓN .....	105
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	106
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>109</b>
1. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES .....	109
2. ANÁLISIS DE LOS MUTADORES SECUNDARIOS.....	115
3. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN .....	129
Gen <i>MLH1</i> .....	130
Gen <i>MSH2</i> .....	140
Gen <i>P16</i> .....	150
Gen <i>P15</i> .....	160
Gen <i>CDH1</i> .....	161
FENOTIPO CIMP.....	162
4. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GEN <i>MLH1</i> .....	165
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>181</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>2135</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>2179</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>247</b>

*RESUMEN*



## RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) constituye una enfermedad heterogénea, cuya aparición depende de múltiples factores hereditarios y ambientales. En las formas hereditarias, los componentes hereditarios de alta penetrancia, son los que establecen, principalmente, un riesgo incrementado de desarrollar tumores colorrectales en los portadores, mientras que se considera la interacción de las variantes de baja penetrancia con los factores medio-ambientales como responsable del desarrollo de gran parte de las formas esporádicas. Se estima que el 85% de estas últimas se desarrolla a través de la vía supresora, caracterizada por una inestabilidad cromosómica, mientras que el 15% restante se desarrolla a través de la vía mutadora, caracterizada por la alteración de los mecanismos de reparación de errores replicativos (MMR), conduciendo a la aparición de la inestabilidad de microsatélites (MSI). En este estudio se analizan las principales alteraciones moleculares implicadas en el mecanismo de la carcinogénesis colorrectal desarrollada por la vía mutadora, además de su relación con las distintas características de estos tumores. Nuestros análisis de la metilación del promotor de los genes *MLH1*, *MSH2*, *P15*, *P16* y *CDH1*, considerada como una de las alteraciones más tempranas en este proceso, revelaron que la inactivación epigenética de los genes *MLH1*, *MSH2* y *P16*, es la principal responsable de la aparición y de la progresión de los tumores MSI-H. Además la inactivación de los mutadores secundarios *BAX* y *TGFBR2*, característica de estos tumores, aparece como una consecuencia directa de la inactivación epigenética de los genes MMR, *MLH1* y *MSH2*. Por otra parte, el número de loci metilados que pueden presentar los tumores de la vía mutadora es directamente proporcional al nivel de inestabilidad de estos tumores, no apareciendo un patrón claro correspondiente al fenotipo CIMP. El análisis de los polimorfismos *MLH1* 415G>C (D132H; rs28930073) y *MLH1* 1852-1853 AA>GC (K618A), ha demostrado que éstos constituyen unas variantes polimórficas infrecuentes en la población española, sin ninguna implicación en la carcinogénesis colorrectal. El polimorfismo *MLH1* 655A>G (I219V, rs1799977), sin embargo, parece conferir un riesgo elevado de cáncer colorrectal, especialmente en varones, en la misma población, aunque podría también tener un efecto positivo en la supervivencia de los pacientes. Por otro lado, el análisis de los mutadores secundarios *TGFBR2* y *BAX* nos ha permitido identificar la implicación de la alteración de cada uno de estos genes en el proceso de la progresión y invasión tumorales y confirmar su importante papel como genes diana en el mecanismo de la carcinogénesis colorrectal desarrollada por la vía mutadora. Por último, nuestros resultados apoyan la utilización de la metilación de los genes *MLH1*, *MSH2* y *P16*, por una parte, y las mutaciones de los genes *BAX* y *TGFBR2*, por otra, como biomarcadores en la tumorigénesis colorrectal, así como factores de pronóstico en los pacientes.



*ABREVIATURAS*





## ABREVIATURAS

ADN	<u>Á</u> cido <u>D</u> esoxirribon <u>u</u> cleico
AECC	<u>A</u> sociación <u>E</u> spañola <u>C</u> ontra el <u>C</u> áncer
AFAP	<u>A</u> ttenuated <u>F</u> AP (Poliposis familiar adenomatosa atenuada)
APC	<u>A</u> denomatous <u>P</u> olyposis <u>C</u> oli
AS-PCR	<u>A</u> llele <u>S</u> pecific- <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
ATP	<u>A</u> denosine <u>T</u> riphosphate
BAX	<u>B</u> CL2- <u>A</u> ssociated <u>X</u> protein
BCL2	<u>B</u> -cell <u>C</u> LL/ <u>L</u> ymphoma 2
BH	<u>B</u> CL2 <u>H</u> omology
BRAF	<i>v-r</i> af murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine (Albumina se suero bovino)
CCR	<u>C</u> áncer <u>C</u> olorrectal
CDH1	<i>E</i> pithelial-cadherin
CDK	<u>C</u> yclin- <u>D</u> ependent <u>K</u> inase (Kinasa dependiente de la ciclina)
CHRPE	<u>C</u> ongenital <u>H</u> ypertrophy of the <u>R</u> etinal <u>P</u> igment <u>E</u> pithelium (hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina)
CIMP	<u>C</u> pG <u>I</u> sland <u>M</u> ethylator <u>P</u> henotype (fenotipo metilador)
CIN	<u>C</u> hromosome <u>I</u> Nstability (inestabilidad cromosómica)
c-MYC	<i>v-m</i> yc myelocytomatosis viral oncogene homolog of avian
CpG	<u>C</u> ytosine- <u>p</u> hosphate- <u>G</u> uanine
dATP	<u>D</u> esoxy <u>A</u> denosine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate
DCC	<u>D</u> eleted in <u>C</u> olorrectal <u>C</u> ancer
dCTP	<u>D</u> esoxy <u>C</u> ytosine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate
dGTP	<u>D</u> esoxy <u>G</u> uanosine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate
DNasa	Desoxirribonucleasa
DSB	<u>D</u> ouble- <u>S</u> trand <u>B</u> reaks (sistema de reparación de las roturas dobles del ADN)
dTTP	<u>D</u> esoxy <u>T</u> hymidine <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate
E.coli	<u>E</u> scherichia coli
EDTA	<u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> cid
EJ	<u>E</u> nd <u>J</u> oining (sistema de unión de extremos de ADN no homólogos)
FAP	<u>F</u> amilial <u>A</u> denomatous <u>P</u> olyposis (Poliposis familiar adenomatosa)
g	Fuerza centrifuga relativa
HDGC	<u>H</u> ereditary <u>D</u> iffuse <u>G</u> astric <u>C</u> ancer (síndrome hereditario de susceptibilidad al cáncer gástrico)
HNPCC	<u>H</u> ereditary <u>N</u> onpolyposis <u>C</u> olorectal <u>C</u> ancer (Cáncer colorrectal hereditario no polipósico)
HR	<u>H</u> omolog <u>R</u> ecombination (sistema de recombinación homóloga)

<b>HR</b>	<u>H</u> azard <u>R</u> atio
<b>IARC</b>	<u>I</u> nternational <u>A</u> gency for <u>C</u> ancer <u>R</u> esearch
<b>IC</b>	<u>I</u> ntervalo de <u>C</u> onfianza
<b>ICG-HNPCC</b>	<u>I</u> nternational <u>C</u> ollaborative <u>G</u> roup on <u>H</u> ereditary <u>N</u> on <u>P</u> olypsis <u>C</u> olorrectal <u>C</u> ancer
<b>IDL</b>	<u>I</u> nsertion/ <u>D</u> eletion <u>L</u> oop
<b>kDa</b>	<u>K</u> ilo <u>D</u> altons
<b>KRAS2</b>	v-ki-ras2 <u>K</u> irsten <u>R</u> A <i>t</i> <u>S</u> arcoma viral oncogene homolog
<b>LOH</b>	<u>L</u> oss <u>O</u> f <u>H</u> eterozygosity (perdida de heterocigosidad)
<b>MAP</b>	<u>M</u> YH <u>A</u> ssociated <u>P</u> olypsis (poliposis asociada al gen MYH)
<b>MAPK</b>	<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
<b>MCR</b>	<u>M</u> utation <u>C</u> luster <u>R</u> egion
<b>MDE</b>	<u>M</u> edium for mutation <u>D</u> etection
<b>MgCl2</b>	Cloruro de magnesio
<b>MGMT</b>	O-6- <u>M</u> ethyl <u>G</u> uanine-DNA <u>M</u> ethyl <u>T</u> ransferase
<b>MLH</b>	<u>M</u> ut <u>L</u> <u>H</u> omolog ( <i>E.coli</i> )
<b>MMP</b>	<u>M</u> icrosatellite <u>M</u> utator <u>P</u> henotype
<b>MMR</b>	<u>M</u> is <u>M</u> atch <u>R</u> epair (sistema de reparación de las bases mal apareadas)
<b>MSH</b>	<u>M</u> ut <u>S</u> <u>H</u> omolog ( <i>E.coli</i> )
<b>MSI</b>	<u>M</u> icro <u>S</u> atellite <u>I</u> nstability (inestabilidad de los microsatélites)
<b>MSP</b>	<u>M</u> ethylation <u>S</u> pecific <u>P</u> CR
<b>MYH</b>	<u>M</u> ut <u>Y</u> <u>H</u> omolog to <i>E.coli</i>
<b>NaOH</b>	Hidróxido sódico
<b>NER</b>	<u>N</u> ucleotide <u>E</u> xcision <u>R</u> epair (sistema de reparación por escisión de nucleótidos)
<b>NH4Ac</b>	Acetato amónico
<b>OMS</b>	<u>O</u> rganización <u>M</u> undial de la <u>S</u> alud
<b>P14</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A); alternate open reading frame (ARF)
<b>P15</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4); INK4b
<b>P16</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, P16, inhibits CDK4); INK4a
<b>Pb</b>	<u>P</u> ares de <u>B</u> ases
<b>PCR</b>	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
<b>PCR-RFLP</b>	PCR- <u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
<b>PMS</b>	<u>P</u> ost <u>M</u> eiotic <u>S</u> egregation increased ( <i>S.cerevisiae</i> )
<b>Polimerasa Taq</b>	Polimerasa <i>Thermus acuaticus</i>
<b>Polimerasa Tth</b>	Polimerasa <i>Thermus thermophilus</i>
<b>Rb</b>	<u>R</u> etino <u>B</u> lastoma

<b>RFC</b>	<b><u>R</u>eplication <u>F</u>actor <u>C</u></b>
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa
<b>RPA</b>	<b><u>S</u>ingle-<u>S</u>tranded <u>B</u>inding-<u>F</u>actor <u>R</u>eplication <u>P</u>rotein <u>A</u></b>
<b>RSV</b>	<b><u>R</u>ous <u>S</u>arcoma <u>V</u>irus</b>
<b>RTK</b>	<b><u>R</u>eceptor de <u>T</u>irosina <u>Q</u>uinasa</b>
<b>S.cerevisiae</b>	<b><u>S</u>accharomyces cerevisiae</b>
<b>SDS</b>	<b><u>S</u>odium <u>D</u>odecyl <u>S</u>ulphate</b>
<b>SNP</b>	<b><u>S</u>ingle <u>N</u>ucleotide <u>P</u>olymorphism</b>
<b>SSCP</b>	<b><u>S</u>ingle <u>S</u>trand <u>C</u>onformation <u>P</u>olymorphism</b>
<b>TBE</b>	<b><u>T</u>ris, ácido <u>B</u>órico <u>E</u>DTA</b>
<b>TGFBR2</b>	<b><u>T</u>ransforming <u>G</u>rowth <u>F</u>actor, <u>B</u>eta <u>R</u>eceptor</b>
<b>THBS1</b>	<b><u>T</u>hrombospondin <u>I</u></b>
<b>TNM</b>	<b><u>T</u>umor <u>N</u>ode <u>M</u>etastasis</b>
<b>TP53</b>	<b><u>T</u>umor <u>P</u>rotein <u>p</u>53</b>
<b>Tris</b>	tri(hidroximetil)amino-metano
<b>Tris-ClH</b>	Tris-Clorhídrico
<b>USM</b>	<b><u>U</u>biquitous <u>S</u>omatic <u>M</u>utations</b>
<b>WNT</b>	<b><u>W</u>ingless <u>S</u>ignaling <u>P</u>athway</b>
<b>5FU</b>	<b><u>5</u>-<u>F</u>luoro<u>U</u>racilo</b>



# *INTRODUCCIÓN*



# INTRODUCCIÓN

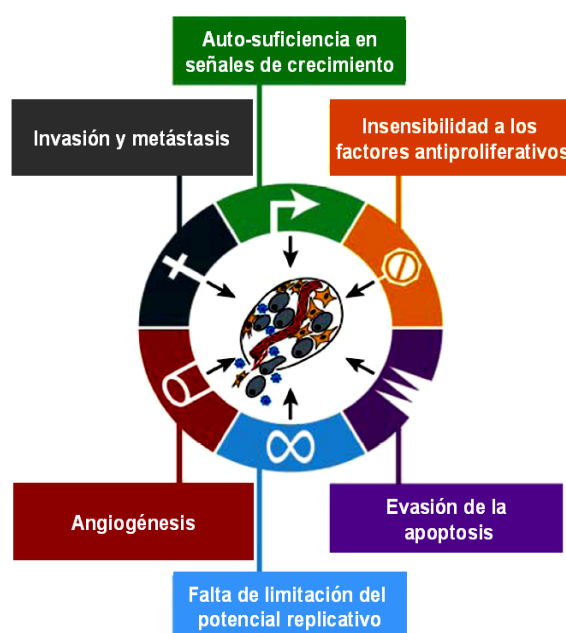
## 1. EL CÁNCER

El cáncer es una enfermedad que ha acompañado al hombre a lo largo de la historia, dado que en Egipto han sido descubiertos papiros de los tiempos de los faraones, 1500-1600 años a.C, donde se describen algunos tipos de tumores junto al tratamiento quirúrgico empleado en la época para su resección. Incluso se han hallado algunas momias con marcas de lesiones óseas en el fémur y en el húmero que se han atribuido a la existencia de tumores. Del mismo modo se han encontrado marcas en algunos huesos de dinosaurios y se ha demostrado que correspondían a la existencia de tumores malignos. La primera definición del cáncer tuvo lugar en los tiempos de Hipócrates (460-370 a.C), quién utilizó la palabra “Karkinos”, cangrejo en griego, para referirse a algunos tumores de mama que presentaban las mujeres, por el aspecto de los vasos sanguíneos a modo de pinzas de un cangrejo que presentaban éstos. Hipócrates además atribuyó esta enfermedad a un exceso de bilis negra producida por el estómago y el bazo. Hoy en día, y después de más de un cuarto de siglo de investigaciones y avances en el cáncer, está completamente admitido que este proceso tiene su origen en múltiples pasos consistentes en sucesivas alteraciones genéticas, dependiendo del tipo celular y sobre todo del tipo de cáncer. Gracias al desarrollo de las diferentes técnicas de genética molecular y al desciframiento del genoma humano, en la actualidad se conocen mejor las causas y las consecuencias de estas alteraciones genéticas y se entienden mejor los mecanismos celulares como la proliferación, la diferenciación y la muerte celular entre otros, tanto en tejidos sanos como tumorales.

Por otra parte, y a pesar de estos avances y logros, el cáncer constituye la segunda causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares; y sigue provocando entre 7 y 8 millones de muertes al año, lo que supone aproximadamente el 13% de todas las muertes anuales a escala internacional, según la Organización Mundial de la Salud (OMS); y cerca de 96.000 muertes al año a escala nacional, o lo que representa alrededor del 25% de las muertes globales, según la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC); indicando que todavía queda mucho camino por recorrer en el ámbito biológico, biomédico, farmacológico y sobre todo en el diagnóstico precoz. Asimismo, según la OMS se prevé un aumento de un 45% de la mortalidad por cáncer a escala mundial entre los años 2007 y 2030, debido en parte al aumento de la industrialización y a los cambios en el estilo de vida, además del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población (Irrigaria *et al.*, 2007).

El nombre genérico “cáncer” hace referencia a un conjunto de más de 200 enfermedades, caracterizadas por una multiplicación anárquica de uno o varios clones de células de un tejido dando lugar a una neoplasia, pasando por varias etapas de proliferación celular y de

transformación neoplásica hasta llegar a la metástasis. Las células con esta última característica son capaces de desplazarse a través de vasos sanguíneos y linfáticos e invadir otros tejidos y órganos hasta provocar la muerte del paciente. El número exacto de las etapas necesarias para la transformación de una célula normal en otra maligna ha sido un tema bastante controvertido entre los autores. Renan y Hanh propusieron que son de 4 a 8 los eventos necesarios para tal transformación (Renan, 1993; Hahn *et al.*, 1999). Más tarde, Hanahan y Weinberg limitaron esta cifra a 6 basándose en el funcionamiento de la maquinaria molecular para regular los mecanismos de la proliferación, diferenciación y muerte celular (Hanahan *et al.*, 2000). Las 6 alteraciones más comunes para la transformación neoplásica se representan en la Figura 1.



**Figura 1.** Las 6 etapas más comunes en el mecanismo de la transformación neoplásica. (Hanahan *et al.*, 2000).

Por otra parte, el número exacto de las etapas así como el mecanismo originado en cada una de ellas dependerán de cada tipo de tumor, cada tipo de gen y de la vía de tumorigénesis desencadenada en cada caso (Quon *et al.*, 2001).

Al contrario de otras enfermedades genéticas, como la fibrosis cística o la distrofia muscular, en las cuales la enfermedad es directamente debida a una mutación concreta en un gen concreto, el cáncer, en general, aparece solamente cuando ocurren alteraciones en varios genes (Vogelstein *et al.*, 2004).

Los genes implicados en las distintas fases de la transformación neoplásica se pueden, en general, agrupar en las siguientes categorías:



- **Oncogenes:**

El descubrimiento de un gen con capacidad de causar una transformación celular data de principios del siglo pasado, gracias a los trabajos realizados sobre el virus del sarcoma aviar (RSV: *Rous Sarcoma Virus*) (Rous, 1911). Tal descubrimiento le otorgó a Peyton Rous el premio Nobel de medicina en 1966. Años más tarde, en 1976, se demostró la existencia de secuencias homólogas al virus v-src en células normales de pollo, que llamaron proto-oncogenes, con el fin de distinguirlos de los oncogenes, responsables de la aparición de tumores (Stehelin *et al.*, 1976; Bishop, 1983).

En humanos, se ha identificado alrededor de 40 proto-oncogenes, implicados en la regulación de los mecanismos de diferenciación, crecimiento, división celular y apoptosis. Por distintas causas, durante la proliferación celular, los proto-oncogenes pueden sufrir la transformación en oncogenes. La activación de estos últimos en la célula supone un paso significativo en el mecanismo de la transformación neoplásica (Willecke *et al.*, 1984; Bishop, 1987).

- **Genes supresores:**

En 1969, Harris y sus colaboradores demostraron la existencia de esta clase de genes, por la fusión de células normales con otras tumorales y observar en muchas de ellas una inhibición de la proliferación y una pérdida de la capacidad oncogénica (Harris *et al.*, 1969). A estos genes se les llamó en un principio “antioncogenes” y se demostró que son genes recesivos, necesitando la alteración de ambos alelos para que la célula pueda desencadenar el mecanismo de la tumorigénesis (Knudson, 1971). La alteración de los genes supresores supone a la célula una pérdida de las funciones de inhibición de la proliferación celular y/o de la inducción de la apoptosis (Harris, 1992). A nivel fisiológico los genes supresores y los oncogenes tienen el mismo efecto durante la progresión tumoral, ya que ambos promueven el incremento del número de células tumorales inhibiendo la detención del ciclo celular o la inducción de la muerte celular, y promoviendo la proliferación (Vogelstein *et al.*, 2004).

- **Genes de reparación del ADN:**

Estos genes se les conoce también como: genes de estabilidad o “*caretakers*” por el papel importante que desempeñan en la corrección de los errores que pueden surgir durante la replicación del ADN, o los daños ocasionados en éste por diversos factores endógenos y exógenos a la célula y, por consiguiente, el mantenimiento de la integridad de este proceso. En general, se han descrito en los mamíferos 4 sistemas de reparación del ADN que actúan en función del tipo de daño ocasionado en éste: **NER** (*Nucleotide Excision Repair*), **BER** (*Base Excision Repair*), **DSB** (*Double-Strand Breaks*) y **MMR** (*Mismatch Repair*). Desde los primeros trabajos de investigación se relacionaron los fallos en este último sistema con el desarrollo de la

tumorigénesis, y tal observación llevó varios investigadores a proponer la existencia de un “fenotipo mutador” como consecuencia de la acumulación de varias alteraciones en las células tumorales (Loeb *et al.*, 1974; Loeb, 1991; Perucho, 1994).

Las mutaciones en estos 3 tipos de genes pueden ocurrir en la línea germinal provocando una predisposición hereditaria al cáncer, o en una célula somática causando la aparición de tumores esporádicos.

Por otra parte, los genes implicados en el mecanismo de la tumorigénesis se pueden igualmente dividir en dos categorías en función de su influencia en el riesgo de padecer CCR:

- **Genes mayores de predisposición:**

Este grupo está compuesto por los genes implicados en las formas hereditarias del cáncer. La transmisión por vía germinal de una variante de estos genes de alta penetrancia supone a los portadores un riesgo incrementado a padecer la enfermedad en cuestión (Fearon, 1997). Sin embargo, a este grupo de genes se les ha atribuido solamente una parte muy limitada de los síndromes hereditarios con un patrón de herencia muy claro, quedando sin explicación los síndromes esporádicos y los hereditarios donde no han sido observadas alteraciones de los genes mayores de predisposición.

- **Genes de susceptibilidad:**

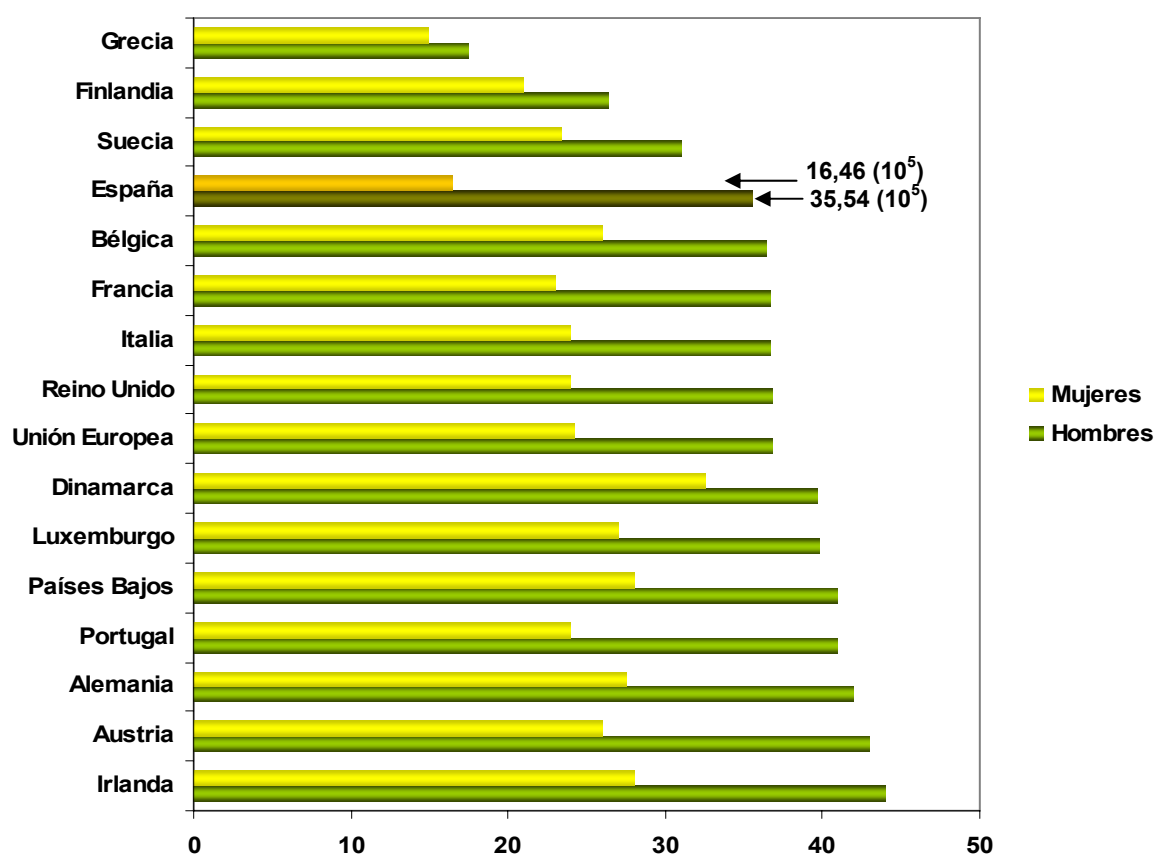
Esta clase de genes se ha descrito en base a la heterogeneidad observada en la incidencia y en los síntomas desarrollados por los miembros de las familias en las que segregan las mismas mutaciones en los mismos genes de predisposición (Fodor *et al.*, 1998). A estos genes se les ha llamado de diferentes maneras: genes de susceptibilidad, genes de baja penetrancia o modificadores tumorales. Estas variantes son capaces de modificar el riesgo del individuo a padecer el cáncer, de modular la respuesta del paciente frente a la enfermedad o incluso de variar la reacción de éste frente a las sustancias utilizadas en los distintos tratamientos, a través de la interacción con factores ambientales, el modo de vida del paciente, su dieta y otros factores. Incluso se ha postulado que los síndromes esporádicos se deberían en su mayoría a la acción combinada de este tipo de genes (Dragani *et al.*, 1996; Balmain, 2002). Además de los genes identificados como modificadores tumorales, encontramos en este grupo los polimorfismos funcionales detectados en los genes mayores de predisposición.

## **2. EL CÁNCER COLORRECTAL**

### **2.1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD**

El cáncer colorrectal (CCR) constituye la afección más común del tubo digestivo y es una de las patologías más frecuentes en los países industrializados. Las incidencias más altas de esta

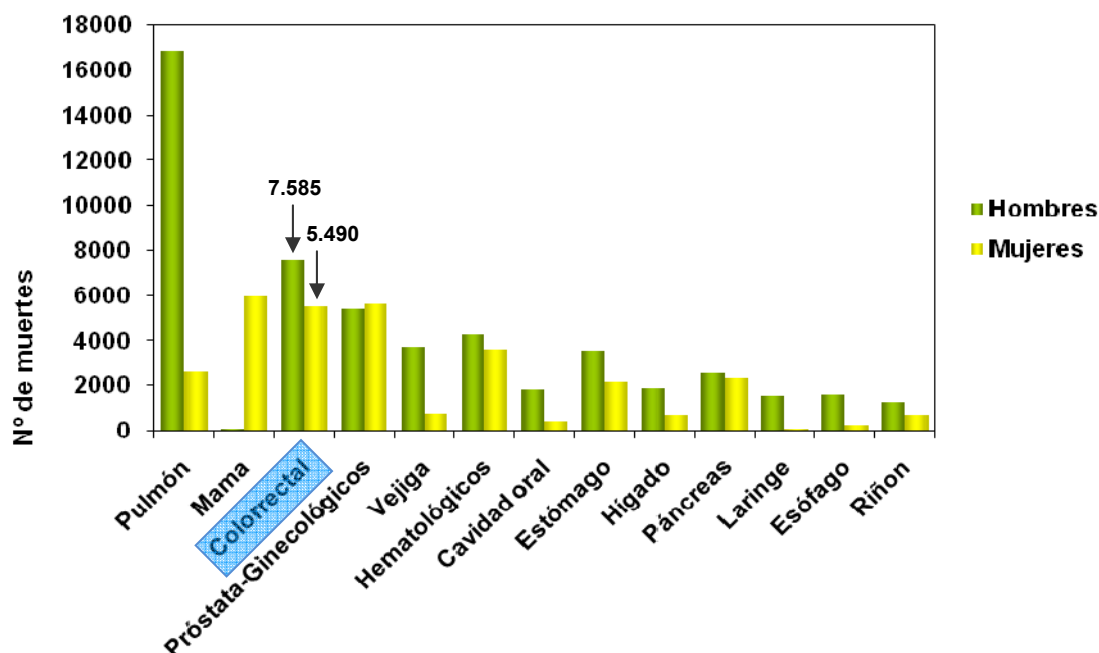
enfermedad se registraron en Estados Unidos y Oceanía (48,3 y 46,5 casos por 100.000 habitantes respectivamente) entre los años 1993 y 1997, según los datos publicados en *Cancer incidence in the five continents vol VIII* (International Agency for Cancer Research (IARC). En Europa, las incidencias más altas se observan principalmente en los países del norte del continente como Irlanda, Alemania o Austria, mientras que las más bajas se encuentran en Grecia, Finlandia y Suecia. En España la incidencia se sitúa ligeramente por debajo de la media europea (Figura 2), aunque en los últimos años ha experimentado un incremento anual de un 2,6%, según los datos publicados por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Asimismo, en el año 1997 se registraron 19.166 casos nuevos de cáncer colorrectal; mientras que esta cifra creció en 2007 hasta 25.600 casos. Este incremento puede estar relacionado con el cambio producido los últimos años en el estilo de vida y sobre todo en los hábitos alimenticios de la población (Ahmed, 2004; Franco *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Comparación entre las incidencias del cáncer colorrectal ajustadas por edad a la población mundial, entre ambos sexos en distintos países de la Unión Europea en 1997 (Fuente IARC).

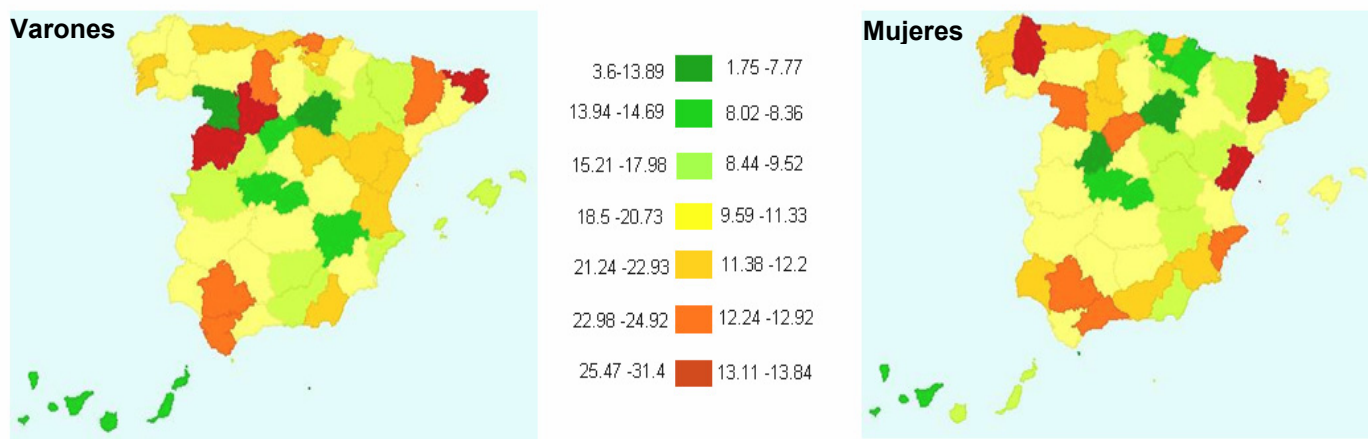
En cuanto a la mortalidad, según los últimos datos de la OMS, el cáncer colorrectal se situó en el año 2005 en la cuarta posición a la escala mundial, detrás de los cánceres de pulmón, estómago e hígado en hombres y, en la tercera posición en mujeres tras el de mama y de pulmón, causando un total de 655.000 muertes, lo que representa alrededor de 16% del total de las muertes por cáncer. En España, el cáncer colorrectal constituyó la segunda causa de muerte por cáncer tras el de pulmón en hombres y, la tercera en mujeres tras el de mama y de los tumores ginecológicos,

en el año 2006, según el Centro Nacional de Epidemiología (Instituto Carlos III), causando un total de 13.075 muertes, o lo que supone el 13,33% del total de las muertes causadas por cáncer a escala nacional. Segmentando por sexos, las muertes por cáncer colorrectal constituyeron el 12,8% en hombres (7.585 muertes), y el 14,9% en mujeres (5.490 muertes) del total de las muertes producidas por cáncer a escala nacional, en el mismo año y según las mismas fuentes. La Figura 3 representa una comparación del número de muertes producidas por los principales cánceres en España, en ambos sexos, en el año 2006.



**Figura 3.** Número de muertes causadas por los principales cánceres en España en ambos sexos en el año 2006 (Centro Nacional de Epidemiología; Instituto Carlos III).

Dentro de España, existe también una diferencia en la distribución de estas tasas entre las diferentes provincias, y entre ambos sexos, siendo éstas ligeramente más bajas en el caso de las mujeres. En el mapa comparativo (Figura 4), observamos que Soria, Ávila y Zamora son las provincias que presentan las tasas de mortalidad más bajas en ambos sexos, mientras que Lugo, Castellón y Lérida en mujeres, y Gerona, Salamanca y Valladolid en varones, son las provincias con las tasas más altas. Así, actualmente, la distribución de la mortalidad por cáncer colorrectal ya no sigue exactamente el patrón norte-sur observado hace unos años por Lopez-Abente y colaboradores (López-Abente *et al.*, 2003). A pesar de estas cifras, bastante altas, la mortalidad por cáncer colorrectal ha experimentado en los últimos años, en general, un descenso bastante significativo sobre todo en los países desarrollados.



**Figura 4.** Mapas de mortalidad provincial por cáncer colorrectal en varones y mujeres para el año 2006. Tasa ajustada a la población Europea/100.000 (Fuente: Instituto de salud Carlos III).

En EE.UU. se ha registrado una reducción del 20,8% en la mortalidad en la última década, gracias a la mejora de los tratamientos y sobre todo a los métodos de diagnóstico precoz, permitiendo detectar las neoplasias en estadios cada vez más tempranos, lo que ha incrementado considerablemente la media de supervivencia de los pacientes y la calidad de vida de estos (Nascimbeni *et al.*, 2009).

## 2.2. ETIOLOGÍA

Se han realizado numerosos estudios epidemiológicos con el fin de esclarecer los factores determinantes en la aparición del cáncer colorrectal. A pesar de ello, la etiología de esta enfermedad sigue todavía sin conocerse completamente, debido por una parte a la cantidad de resultados contradictorios obtenidos en estos estudios, y por otra parte al carácter multifactorial de la enfermedad; haciendo que la aparición del cáncer colorrectal sea el resultado de la interacción de numerosos factores, cuyo riesgo individual cambia en función de la persona y del medioambiente.

El cáncer colorrectal, al igual que otras enfermedades del tubo digestivo, ha sido relacionado con los malos hábitos alimenticios; de hecho, se ha estimado que aproximadamente el 70% de los cánceres colorrectales se pueden prevenir en base a la dieta (Stewart *et al.*, 2003). Así, se consideran las dietas ricas en colesterol, grasas animales, proteínas y calorías, además del tabaco, como factores de alto riesgo, mientras que las dietas ricas en fibra, agentes antioxidantes y calcio, además del ejercicio físico, como protectoras frente a este tipo de tumores (Levi *et al.*, 1999; Riboli *et al.*, 2003; Berrino *et al.*, 2003; Solera *et al.*, 2007). En cuanto a las carnes rojas, muchos trabajos han demostrado que su verdadero riesgo reside principalmente en la manera de su cocción y no en su consumo (Martínez *et al.*, 2007; Santarelli *et al.*, 2008). Asimismo, muchos

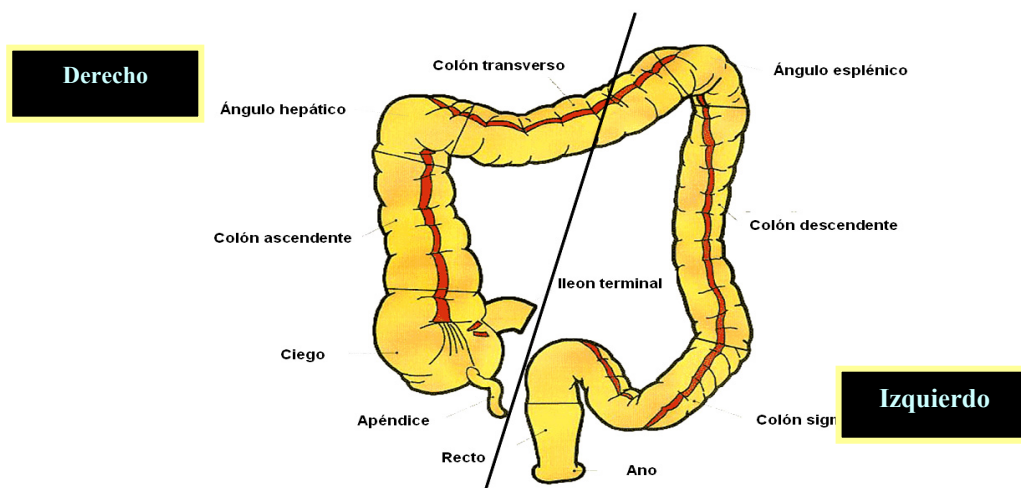
autores han descrito el sobrepeso y la obesidad como factores que pueden incrementar considerablemente el riesgo de padecer el cáncer de colon y recto (Vainio *et al.*, 2002; Jacobs *et al.*, 2007). La historia clínica del propio paciente puede igualmente influir en la susceptibilidad de desarrollar tumores colorrectales, ya que el hecho de presentar pólipos en el colon o alguna enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa o la enfermedad de Crohn), por una parte, o presentar antecedentes del propio cáncer de colon, cáncer de útero, de ovario o de mama por otra, pueden aumentar igualmente la probabilidad de padecer CCR (Svrcek *et al.*, 2007; Weinberg *et al.*, 1999). Por otra parte, en muchos estudios se ha sugerido la asociación del CCR con la localización geográfica y con el estatus económico, siendo la enfermedad poco común en Asia, África y América del sur (Flood *et al.*, 2000; Parkin *et al.*, 2005). Pero sin ninguna duda, uno de los factores más determinantes en la aparición y el desarrollo de esta dolencia es la edad, ya que aproximadamente el 92,5% de los casos en España aparecen en pacientes mayores de 50 años de edad (Viñes *et al.*, 2003), y este riesgo se ve incrementado aún más con los antecedentes familiares. Efectivamente, muchos estudios epidemiológicos y de síndromes familiares, sugieren que la susceptibilidad a padecer CCR aumenta en las personas con familiares afectados de tumores colorrectales. Además, este riesgo aumenta con el número de familiares afectados y el grado de parentesco, multiplicándose casi por tres en el caso de los individuos con familiares afectados de primer y segundo grado (Solera *et al.*, 2007).

### **2.3. DIAGNÓSTICO**

Clínicamente, el CCR se detecta generalmente en un estado avanzado, con una historia clínica corta y se presenta como una urgencia quirúrgica, puesto que las primeras fases de su desarrollo no producen síntomas. Existen varios métodos que se utilizan en la detección de los tumores colorrectales tales como sigmoidoscopia y colonoscopia, tacto rectal, prueba de la sangre oculta en heces (PSOH), ecografía abdominal y tomografía axial computarizada (TAC). Muchas de estas técnicas se utilizan tanto como estrategias de detección precoz de la enfermedad para los mayores de 50 años, como prevención de la enfermedad, sobre todo en el caso de los pacientes con una historia familiar del CCR, en edades más tempranas.

### **2.4. LOCALIZACIÓN DE LOS TUMORES**

El colon constituye la primera sección del intestino grueso que se extiende desde la válvula ileocecal hasta el recto; se divide en 4 segmentos: ascendente, transversal, descendente y sigmoide, y tiene una longitud aproximada de 1,5 m y un diámetro de 4 a 6 cm. El recto es la última porción del tubo digestivo y se extiende desde el ángulo sigmoide hasta el canal anal y ocupa unos 12 a 15 cm en adultos (Figura 5). Por la falta de especificación de los límites entre el colon y el recto, los tumores en ambas partes se suelen estudiar conjuntamente.



**Figura 5.** Anatomía del colon y el recto.

En 1990, Bufill propuso la existencia de dos categorías de tumores colorrectales en base a su localización en la sección derecha o izquierda al ángulo esplénico del colon. Tal hipótesis se basó en la observación de que los tumores localizados en estas dos partes presentaban propiedades clínicas, citológicas, moleculares y patológicas distintas y se desarrollaban a través de dos mecanismos de carcinogénesis independientes (Bufill, 1990). A pesar de las diferencias entre los clínicos para definir qué segmentos del colon pertenecen exactamente a un lado u otro, se consideran generalmente el ciego, el colon ascendente y la porción proximal del colon transversal como partes constituyentes del colon proximal (derecho), mientras que el segmento restante del colon transversal, el colon descendente y el recto serían pertenecientes al colon distal (izquierdo) (Figura 5). Una de las explicaciones de la existencia de tantas diferencias entre ambas secciones del colon es el origen embrionario distinto de cada una de ellas: el colon proximal tiene su origen en el intestino medio embrionario y recibe sangre de la arteria mesentérica superior, mientras que el colon distal tiene origen en el intestino embrionario posterior y recibe sangre de la arteria mesentérica inferior. Diferencias histológicas como la existencia de una red capilar multicapa en la microcirculación sanguínea del colon derecho y de capa única en el colon izquierdo (Araki *et al.*, 1996); metabólicas, como la diferencia en el metabolismo de los ácidos biliares (Thomas *et al.*, 2001); genéticas, como la variabilidad de la expresión de algunas isoformas del citocromo P-450 (Mercurio *et al.*, 1995); la inestabilidad cromosómica (CIN) característica de los tumores del colon izquierdo, y la inestabilidad de microsatélites (MSI) característica de los tumores del colon derecho (Lindblom, 2001), hacen que los tumores que aparecen en un lado u otro tengan una respuesta distinta a los diferentes factores medioambientales y dietéticos, dependiendo también de la edad, sexo del paciente y la localización geográfica (Iacopetta, 2002). Asimismo, se ha demostrado que los pacientes con tumores en el colon proximal presentan una mejor supervivencia y una mejor respuesta a la



quimioterapia que los pacientes portadores de tumores en el colon distal (Elsaleh *et al.*, 2000). Iacopetta resumió las diferentes características clínicas y moleculares de ambas secciones del colon en la siguiente tabla:

Característica	Proximal	Distal
Edad al diagnóstico	Mayores	Jóvenes
Sexo del paciente	Mayoría mujeres	Mayoría varones
Tumores mucinosos	Frecuente	Infrecuente
Síndrome de cáncer familiar	HNPCC	FAP
Beneficio de la quimioterapia (5FU)	Bueno	Marginal o nulo
Ploidía	Mayoría diploides	Mayoría aneuploides
Perdida de heterocigosidad (LOH)	Infrecuente	Frecuente
Mutaciones del gen <i>TP53</i>	20-30%	50-60%
MSI +	25%	2-3%
CIMP +	25-40%	3-10%

**Tabla 1.** Características clínicas y moleculares de las secciones proximal y distal del colon por Iacopetta (Iacopetta, 2002). HNPCC: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico. FAP: Poliposis familiar adenomatosa. 5FU: 5-fluorouracilo. CIMP: fenotipo metilador.

Por otra parte, se ha descrito que aproximadamente el 60% de los tumores diagnosticados en las zonas geográficas de alta incidencia tienen una localización izquierda. Sin embargo, en los últimos años se ha observado una tendencia a aumentar la incidencia de los tumores del colon derecho y un descenso de la de los tumores localizados en el colon izquierdo. Tal cambio puede deberse a la utilización, cada vez más frecuente, de técnicas de detección precoz como la colonoscopia y la sigmoidoscopia seguidas de la resección de los posibles pólipos o adenomas detectados (Obrand *et al.*, 1998).

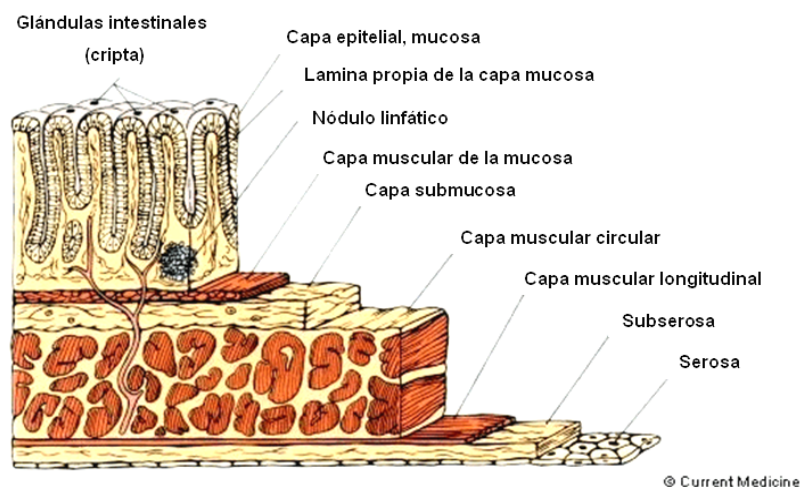
## 2.5. CLASIFICACIÓN

El tratamiento del cáncer colorrectal y su curación dependen en gran medida del estadio en el cual se detecta el tumor, siendo su curación casi completa cuando se diagnostica en las primeras etapas de desarrollo. De ahí surge la necesidad de adoptar un sistema de clasificación que permita estandarizar los datos entre los clínicos sin ambigüedad, y poder establecer el tratamiento conveniente para cada estadio. Los sistemas de clasificación son de gran utilidad especialmente en el caso de los tumores sólidos.

La clasificación de los tumores se puede realizar en base a muchas variables; de las que aportan más información clínica y también biológica están la clasificación histológica y



citológica, permitiendo determinar el tipo del tumor así como su grado de extensión y de diseminación en la pared intestinal. En la Figura 6 se representa la estructura histológica de la pared del colon normal.



**Figura 6.** Estructura histológica de la pared normal del colon.

### 2.5.1.CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA

Del 90 al 95% de los tumores colorrectales son de tipo adenocarcinoma, originándose en el epitelio glandular de la mucosa colorrectal. Este tipo de tumores crece invadiendo la muscularis mucosae, la submucosa y las capas musculares hasta invadir vasos sanguíneos, linfáticos, órganos adyacentes o metastatizarse a distancia.

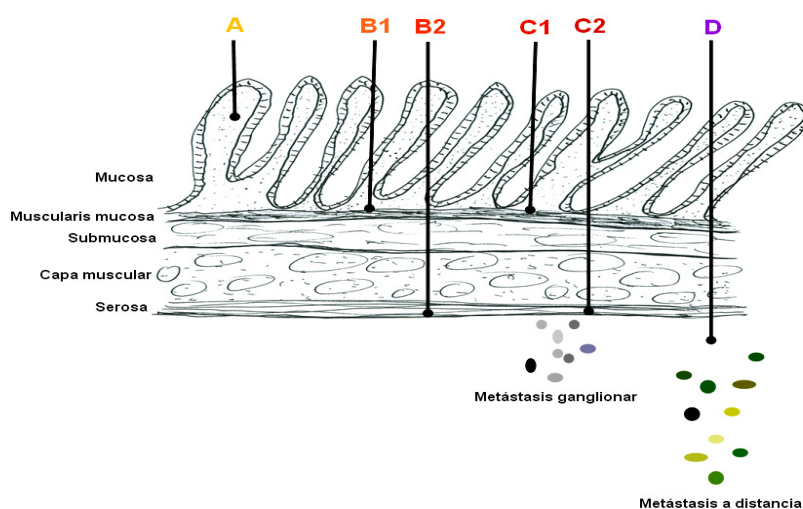
Los adenocarcinomas se pueden clasificar, en base a la similitud histológica que guardan con las células normales del tejido donde se originó el tumor en: bien, moderadamente o pobremente diferenciados; siendo los tumores bien diferenciados aquellos que presentan unas glándulas bien formadas con unas células columnares malignas y un mínimo de lesiones genéticas. Los tumores pobremente diferenciados son aquellos que presentan unas células pleomórficas con una escasa o nula formación de glándulas, una alta incidencia de mitosis e incluso metástasis, mientras que los tumores moderadamente diferenciados corresponden al grado de diferenciación intermedio. Tal sistema de clasificación, propuesto por Broders en 1925, se basa en el porcentaje de células diferenciadas en cada tumor (Broders, 1925). Años más tarde este sistema fue modificado por Dukes basándose en la conformación que presentaban las células del tumor más que en el porcentaje de éstas (Dukes, 1932). Otro tipo histológico de tumores son los adenocarcinomas mucinosos o coloides, caracterizados por una producción de mucina intra o extracelular. Este tipo de tumores representa el 17% de los tumores colorrectales. Cuando la mucina producida es intracelular el tipo de tumor resultante es el carcinoma de células en anillo-sello, denominado así por el aspecto que presentan estas células al empujar el núcleo hacia la membrana celular por la mucosa producida. Este tipo de tumores representa solamente del 4 al

6% de los adenocarcinomas mucinosos. Existen otras variantes de tumores epiteliales todavía menos frecuentes como los carcinomas indiferenciados, donde no se encuentran estructuras glandulares ni producción de mucina, los carcinomas de células escamosas, los carcinomas adenoescamosos, igualmente llamados adenocantomas, los linfomas, sarcomas y plasmocitomas.

### 2.5.2. CLASIFICACIÓN CLINICOPATOLÓGICA

El primer sistema de clasificación anatomopatológica de los tumores colorrectales fue establecido por Lockhart-Mummery en 1926 quién, basándose en la infiltración macroscópica del tumor en la pared intestinal y la movilidad de este, clasificó la enfermedad en 3 estadios: de A a C (Lockhart-Mummery, 1926). Manteniendo este sistema, Dukes estableció la primera clasificación histopatológica para los tumores rectales que luego se aplicó igualmente a los tumores del colon (Dukes, 1932). Este sistema ha ido después modificándose con el fin de alcanzar una mayor precisión. Actualmente, el sistema más utilizado es el propuesto por Dukes, incluyendo cuatro estadios de A a D, con las modificaciones propuestas por Astler y Collier que aportan más subdivisiones dentro del mismo estadio (Astler *et al.*, 1954) (Figura 7):

- **Estadio A:** Extensión limitada a la mucosa y submucosa.
- **Estadio B:**
  - **B1:** Extensión limitada a la muscularis mucosa sin rebasarla.
  - **B2:** Extensión afectando toda la capa muscular llegando a la serosa o a la grasa perirrectal.
- **Estadio C:**
  - **C1:** Igual que el estadio B1 con afectación de los ganglios linfáticos.
  - **C2:** Igual que el estadio B2 con afectación de los ganglios linfáticos.
- **Estadio D:** Presencia de metástasis a distancia.



**Figura 7.** Representación de los estadios de Dukes con la modificación de Astler-Collier.

En los años cincuenta, el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *International Union Against Cancer* (UICC) propusieron otro sistema de clasificación anatomopatológica para los tumores colorrectales denominado sistema TNM, de sus siglas en inglés (*Tumor Node Metastasis*) (Denoix, 1954; Wood *et al.*, 1979), igualmente recomendado por la *American College of Surgeons*. El sistema TNM es más complejo que el sistema de Dukes y se basa en la extensión tumoral (T), ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos (N: nódulo) y ausencia o presencia de metástasis a distancia (M). Cada una de estas categorías se divide en varias subdivisiones (Tabla 2).

En base a la evaluación del estado tumoral y del paciente se administra el tratamiento adecuado, siendo la resección quirúrgica del tumor el tratamiento más común y más curativo, especialmente en el caso de los tumores en las primeras etapas de crecimiento. Por otra parte, la recurrencia tumoral posterior a la resección curativa supone el mayor problema y la principal causa de muerte del paciente (Olson *et al.*, 1980; Zampino *et al.*, 2004).

Categoría	Subdivisiones	Significación
<b>T: Tumor primario</b>	<b>TX</b>	Tumor Primario. No especificado por la falta de información.
	<b>T0</b>	No hay evidencia de la existencia del tumor.
	<b>Tis</b>	Carcinoma in situ: Etapa temprana, no rebasa la mucosa.
	<b>T1</b>	Tumor invade la submucosa.
	<b>T2</b>	Tumor invade la muscularis propia.
	<b>T3</b>	Tumor invade la muscularis propia hasta la subserosa sin llegar a los tejidos u órganos vecinos.
	<b>T4</b>	Tumor invade órganos o tejidos vecinos y/o perfora el peritoneo visceral.
<b>N: ganglios linfáticos regionales</b>	<b>NX</b>	Daño de los ganglios no especificado por falta de información.
	<b>N0</b>	Ningún ganglio linfático afectado.
	<b>N1</b>	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales.
	<b>N2</b>	Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.
	<b>N3</b>	Metástasis en cualquier ganglio linfático regional.
<b>M: Metástasis a distancia</b>	<b>MX</b>	Metástasis a distancia no especificada por falta de información.
	<b>M0</b>	No existe metástasis en los órganos distantes.
	<b>M1</b>	Existe metástasis en los órganos distantes.

**Tabla 2.** Categorías y subdivisiones del sistema de clasificación TNM y significación de éstas.

## 2.6. VÍAS MOLECULARES DE LA TUMOROGÉNESIS COLORRECTAL

Los tumores colorrectales constituyen un excelente modelo neoplásico para el estudio genético, así como histológico, de la evolución de los tumores epiteliales. La progresión histológica de un epitelio hiperplásico a un carcinoma metastásico consiste en una secuencia de cambios genéticos, incluyendo mutaciones puntuales, inserciones/deleciones, alteraciones epigenéticas, etc..., que afectan a una serie de genes clave en el proceso de la transformación neoplásica. El patólogo Basil Morson fue el primero en describir la secuencia histológica de esta transformación (Muto *et al.*, 1975), mientras que la secuencia genética paralela fue descrita años más tarde por Fearon y Vogelstein, y también por Bodmer (Fearon *et al.*, 1990a; Bodmer, 1997). En este proceso multifásico, se ha descrito que las mutaciones en el gen *APC* constituyen un evento precoz, iniciando la transformación neoplásica, seguidas por mutaciones en otros genes como *KRAS2* y *TP53* y *DCC*. Cada una de ellas produce un paso significativo en el proceso de la expansión clonal y por consiguiente en el desarrollo tumoral (Fearon *et al.*, 1990a; Nowell, 2002; Vogelstein *et al.*, 2004). Más adelante a esta vía de tumorogénesis se le denominó **Supresora**, por el tipo de genes implicados en la misma.

Por otra parte, se ha observado que los pacientes con HNPCC presentan unos adenomas de mayor tamaño y más displásicos que los que presentan los pacientes con CCR esporádico. Además, estos tumores presentan una secuencia de alteraciones distintas a las de la vía supresora, afectando especialmente a los genes responsables de la corrección de los errores postreplicativos del ADN (MMR), lo que llevó a proponer una vía de tumorogénesis, **Mutadora**, alternativa a la propuesta por Fearon y Vogelstein (Thibodeau *et al.*, 1993; Aaltonen *et al.*, 1993; Ionov *et al.*, 1993). Dicha vía desemboca en un fenotipo mutador, considerado como responsable de la aceleración del proceso de transformación neoplásica (Loeb, 1991). Los tumores que progresan a través de estas dos vías presentan unas características genéticas y clinicopatológicas distintas, y corresponden a los dos tipos de inestabilidad genómica descrita: **CIN** y **MSI**, características de los dos grandes síndromes hereditarios del CCR: FAP y HNPCC, respectivamente.

Aparte de las dos grandes rutas de tumorogénesis colorrectal: la mutadora y la supresora, se ha propuesto en los últimos años la existencia de una vía intermedia entre las dos denominada: **Mutadora Intermedia** (*Mild Mutator pathway*), y de otra vía distinta a las anteriores: **Vía Serrada**.

### 2.6.1. VÍA SUPRESORA Y CIN

A través de esta vía se desarrolla aproximadamente el 85% de los casos de CCR esporádico y los casos hereditarios derivados de la FAP. Los tumores desarrollados por esta vía sufren múltiples alteraciones cromosómicas tanto numéricas, que dan lugar a aneuploidías, como

estructurales tales como deleciones, amplificaciones, translocaciones, inversiones segmentarias, etc. Dicha inestabilidad cromosómica (CIN) aparece como resultado de recombinaciones mitóticas aberrantes así como por fallos de la segregación durante la mitosis. Los tumores de esta vía se caracterizan igualmente por pérdidas de heterocigosidad (LOH: *Loss Of Heterozygosity*) detectadas en varios *loci*, además de sufrir mutaciones inactivadoras de los genes supresores de tumores, tales como: *APC*, *TP53*, *DCC*, *SMAD2*, *SMAD4*,... y activadoras de los oncogenes como el gen *KRAS2* (Fearon *et al.*, 1990a) (Figura 8).

La aparición de aneuploidía en estos tumores se ha detectado en etapas tempranas del desarrollo tumoral; además se ha observado que el contenido en ADN de estas células tumorales se incrementa a medida que aumenta la displasia tumoral (Goh *et al.*, 1986; Quirke *et al.*, 1988; Shih *et al.*, 2001). Tal inestabilidad cromosómica ha sido atribuida a varias causas. Se ha descrito que la hipometilación del ADN, detectada en la etapa de la transformación del epitelio hiperplásico en adenoma temprano, es posiblemente la responsable de este fenómeno (Lengauer *et al.*, 1997a). Por otra parte, se piensa que la CIN sería debida a la acción de la proteína APC junto a la proteína EB1 (*End-Binding protein 1*), responsables de mantener la conexión entre los microtúbulos del huso mitótico y los cromosomas metafásicos durante la mitosis, por lo que las alteraciones del gen *APC* causarían una segregación cromosómica aberrante (Fodde *et al.*, 2001; Tighe *et al.*, 2004). Se ha sugerido también que los defectos en los puntos de control del ciclo celular (*checkpoints*), responsables de la supervisión del funcionamiento correcto del ciclo celular, así como de la detención de este en caso de detección de errores con el fin de corregirlas; o defectos en los genes implicados en los checkpoints podrían inducir la inestabilidad cromosómica. Asimismo, se ha demostrado que los genes *BUB1* y *BUBR1* (*BUB: Bundling Uninhibited by Benzimidazole*), implicados en el punto de control mitótico presentaban mutaciones en las líneas celulares de cáncer colorrectal con CIN (Cahill *et al.*, 1998; Auki *et al.*, 2007), y que la alteración del gen *MAD2* (*Mitotic Arrest Defective protein 2*), igualmente implicado en el punto de control mitótico, aumenta la probabilidad de desarrollar tumores y de inducir inestabilidad cromosómica (Michel *et al.*, 2001). Los tumores con CIN tienen una localización preferente en el colon izquierdo, son más agresivos y presentan peor pronóstico.

### 2.6.2.VÍA MUTADORA Y MSI

Por esta vía se desarrollan del 15 al 20% de los tumores esporádicos y alrededor del 80% de los casos hereditarios pertenecientes a las familias Lynch (HNPCC). Estos tumores tienden a localizarse en el colon derecho, son menos agresivos y presentan un mejor pronóstico. A diferencia de los tumores de la vía supresora, los tumores de la vía mutadora son diploides o pseudodiploides. Sin embargo, se ha observado que éstos presentan otro tipo de inestabilidad

genómica (**MSI**) que consiste en una acumulación de errores en unas pequeñas secuencias repetitivas de ADN: **los microsatélites** (Thibodeau *et al.*, 1993).

**Los microsatélites** pertenecen al grupo de secuencias de ADN repetidas en tándem, representando aproximadamente el 10% de todo el genoma. La naturaleza de estas secuencias hace que sean inestables y proclives a sufrir pequeñas inserciones/deleciones, llevando a la formación de pequeños bucles (Bucles de Inserción/Delección: IDL). La aparición de estas mutaciones es debida al “deslizamiento” que puede sufrir la polimerasa en las unidades de repetición de los microsatélites durante la replicación del ADN (*Replication slippage*) (Ionov *et al.*, 1993; Armour, 1996). La mayoría de los microsatélites afectados en esta vía de carcinogénesis se componen especialmente de repeticiones mono y dinucleotídicas (Parsons *et al.*, 1993; Risinger *et al.*, 1993; Aaltonen *et al.*, 1994). En condiciones normales la célula mantiene el equilibrio homeostático, en parte gracias a la existencia de varios sistemas de corrección de errores. Uno de ellos es el sistema **MMR**, responsable de la corrección de los errores de la replicación del ADN, especialmente los nucleótidos desapareados y los pequeños IDL originados por el deslizamiento de la polimerasa en los microsatélites (Modrich, 1991; Jiricny, 1998a). En humanos, se han descrito hasta el momento 7 genes componentes del sistema MMR: *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2* (Fishel *et al.*, 1993; Bronner *et al.*, 1994; Nicolaides *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Akiyama *et al.*, 1997; Miyaki *et al.*, 1997). En los genes *MLH1* y *MSH2* y, en menor medida *MSH6*, se han descrito la mayoría de las mutaciones germinales en los síndromes hereditarios desarrollados por esta vía de carcinogénesis, como el síndrome de Lynch (Leach *et al.*, 1993; Bronner *et al.*, 1994; Berends *et al.*, 2002; Peltomäki *et al.*, 2004; Peltomäki, 2005), mientras que los casos esporádicos que progresan por esta vía se han asociado principalmente con la alteración epigenética del gen *MLH1*, a través de la metilación de su promotor provocando el silenciamiento somático de éste (Kane *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 1998; Toyota *et al.*, 1999; Kuismanen *et al.*, 2000). Se ha calculado que la frecuencia de mutaciones en las células con el sistema MMR alterado puede llegar a ser 1000 veces mayor que en las células normales (Eshleman *et al.*, 1995). Esta acumulación de errores ha recibido varias denominaciones: **USM:** (*Ubiquitous Somatic Mutations*) (Ionov *et al.*, 1993), **RER:** (*Replication Errors*) (Peltomäki *et al.*, 1993), y **MIN/MSI:** (*Microsatellite instability*) (Thibodeau *et al.*, 1993). El fenotipo que presentan las células tumorales portadoras de estas alteraciones se le denomina **MMP** (*Microsatellite Mutator Phenotype*) (Loeb, 1991; Perucho, 1994).

Posteriormente, en 1997, cuando se celebró "*The International Workshop on Microsatellite Instability and RER Phenotypes in Cancer Detection and Familial Predisposition*", Boland y otros autores establecieron la existencia de 3 niveles de MSI en función del número de los microsatélites inestables, en un panel de 5 microsatélites estandarizados. Estos niveles son:

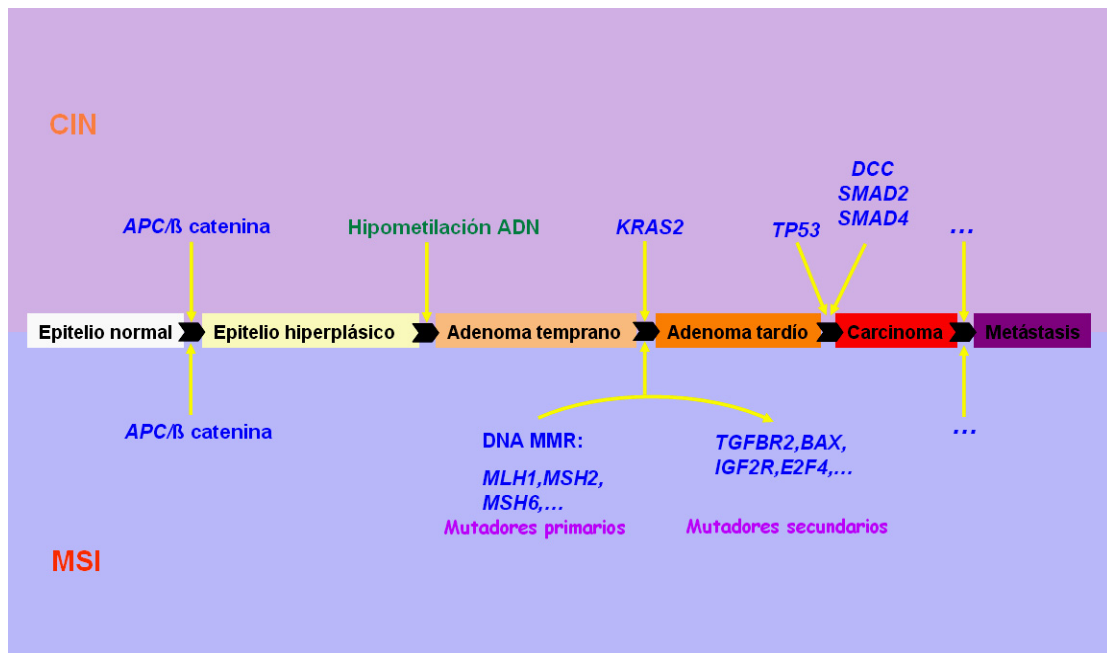
**MSI-H**: alta inestabilidad de microsatélites (cuando el tumor presenta al menos 40% de los marcadores inestables); **MSI-L**: baja inestabilidad de microsatélites (cuando el tumor presenta menos de 40% de los marcadores inestables, y **MSS**: cuando todos los microsatélites son estables (Boland *et al.*, 1998).

El hecho de que las alteraciones de los genes del sistema MMR sean responsables de la aparición de mutaciones en otros genes cuyas secuencias incluyen microsatélites, llevó a denominar a los primeros **Mutadores primarios** y a los segundos **Mutadores secundarios**. Los mutadores secundarios pueden ser genes con diferentes implicaciones en los mecanismos celulares: regulación de la muerte celular programada, como el gen proapoptótico *BAX* (Rampino *et al.*, 1997), proliferación y diferenciación celular, como el gen *TGFBR2* (Myeroff *et al.*, 1995) y el gen *IGF2R* (Ouyang *et al.*, 1997), control del ciclo celular, como el gen *E2F4* (Ikeda *et al.*, 1998), etc. La alteración de los mutadores primarios ha sido incluso descrita como responsable de la alteración de otros genes del mismo sistema MMR, como los genes *MSH3* y *MSH6* (Malkhosyan *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 2001).

Por otra parte, se ha observado en esta vía de carcinogénesis que las mutaciones en el gen *APC* constituyen un evento temprano, igual que en la vía supresora (Huang *et al.*, 1996) (Figura 8). Sin embargo, las mutaciones en los genes *KRAS2* y *TP53* han sido detectadas en unas frecuencias mucho más bajas que las observadas en la vía supresora. Se ha propuesto que las mutaciones del gen *TP53* en esta última vía estarían sustituidas por las mutaciones en el gen proapoptótico *BAX* en la vía mutadora, ya que ambas alteraciones llevan la célula tumoral a la misma ventaja selectiva, que es una resistencia relativa a la apoptosis (Grady, 2004).

La Figura 8 resume las etapas genéticas más destacables en el proceso de la carcinogénesis colorrectal a través de las dos grandes vías: Supresora y Mutadora.





**Figura 8.** Resumen de las etapas de la carcinogénesis colorrectal, a través de las 2 grandes rutas CIN y MSI. Modificado de (Chung, 2000).

En este proceso de malignización, cada alteración hace adquirir a la célula tumoral un fenotipo más agresivo en función de la vía de carcinogénesis, hasta llegar a la metástasis. Se ha descrito que la divergencia de la célula tumoral hacia CIN o MSI ocurre después de la primera etapa que consiste en la alteración del gen *APC* y la formación del microadenoma (Kinzler *et al.*, 1996; Tomlinson *et al.*, 1998), y que las mutaciones a lo largo de la transformación neoplásica ocurren en un orden preferencial (Fearon *et al.*, 1990a). No obstante, se ha demostrado que las dos vías, supresora y mutadora, no son completamente independientes, y muchos tumores colorrectales presentan ambos fenotipos, sugiriendo la existencia de otras vías alternativas de carcinogénesis como resultado del solapamiento de las dos (Tomlinson *et al.*, 1998; Fearnhead *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2003).

### 2.6.3.VÍA MUTADORA INTERMEDIA

Durante mucho tiempo, los autores han considerado los tumores MSI-L como similares a los tumores MSS, y que la única diferencia que existía entre ambos grupos era cuantitativa consistiendo en el análisis de un mayor número de microsatélites con el fin de poder distinguir entre ambos grupos (Boland *et al.*, 1998; Tomlinson *et al.*, 2002). Sin embargo, numerosos trabajos se centraron en este grupo de tumores con el fin de demostrar que los tumores MSI-L constituyen una entidad independiente de los tumores MSS y MSI-H, con unas características moleculares y patológicas propias y desarrollándose a través de una vía de carcinogénesis distinta (Iino *et al.*, 1999; Jass *et al.*, 1999b; Rudzki *et al.*, 2003). Asimismo, estudios de nuestro grupo



han demostrado que los tumores MSI-L presentan una localización preferencial en el colon izquierdo, son bien o moderadamente diferenciados, preferentemente se encuentran en el estadio de desarrollo B de Dukes y presentan una alta frecuencia de mutaciones en el gen *KRAS2*. Además, los tumores MSI-L portadores de mutaciones en el gen *KRAS2*, *TP53* o *DCC* muestran tendencia a presentar una peor supervivencia (Oliart *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que los tumores MSI-L forman un grupo de características intermedias entre los tumores estables y los de alta inestabilidad, desarrollándose a través de una vía que muchos autores denominan **Vía mutadora intermedia (Mild Mutator pathway)** (Oliart *et al.*, 2006; Jass, 1999a; Iino *et al.*, 1999; Okon *et al.*, 2006; Asaka *et al.*, 2009).

#### 2.6.4.VÍA SERRADA

Esta vía de carcinogénesis se describió hace pocos años, al observarse que una parte de los pólipos hiperplásicos, considerados durante mucho tiempo como lesiones benignas, completamente desvinculadas del mecanismo de la transformación neoplásica, podrían igualmente evolucionar en carcinomas colorrectales (Yao *et al.*, 1999; Jass, 1999a). Se calcula que 10 a 15% de los tumores esporádicos se desarrolla a través de esta vía de carcinogénesis, y que los adenocarcinomas serrados pueden representar hasta el 7,5% del total de los cánceres colorrectales y más del 17,5% de los tumores con localización en el colon derecho (Mäkinen, 2007).

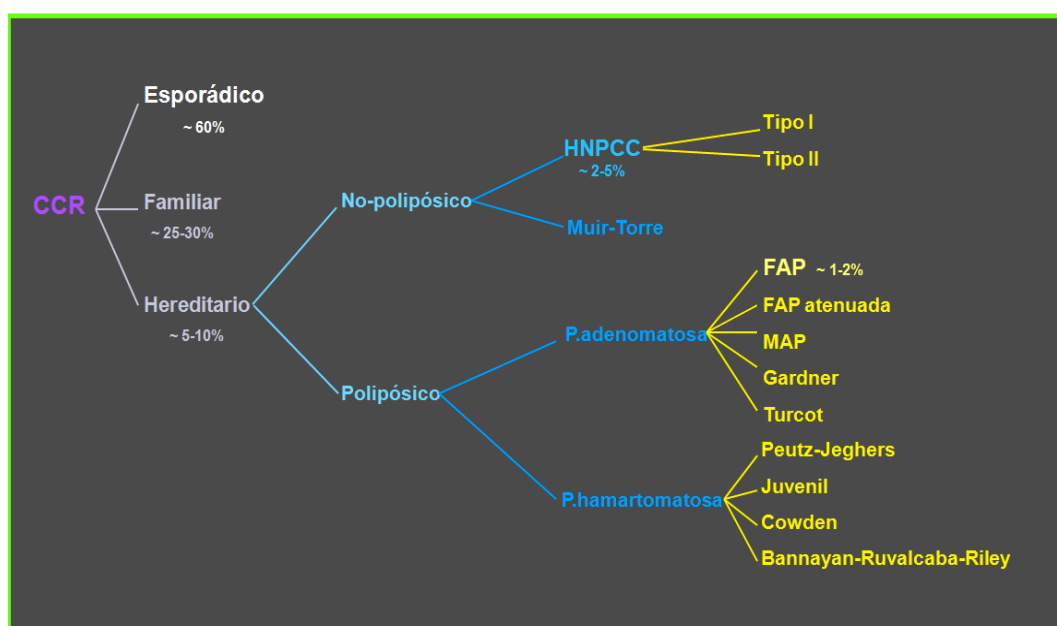
Este grupo de tumores es bastante amplio y heterogéneo, no solamente por el tipo de pólipos que lo componen, sino también por las alteraciones moleculares descritas como causantes de los mismos. Este conjunto incluye los pólipos serrados, llamados así por su contorno que presenta una morfología similar a los dientes de sierra, los pólipos mixtos, los adenomas serrados clásicos y los recientemente descritos como adenomas sésiles serrados, y se consideran los focos de cripta aberrante (ACF: *Aberrant crypt foci*) como las lesiones precursoras de este tipo de pólipos (Cheng *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha descrito que, en general, se requieren dos procesos esenciales para iniciar la tumorigénesis a través de esta vía: una inhibición de la apoptosis, a través de la alteración de los oncogenes *KRAS2* y *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) (Jass *et al.*, 2002; Mäkinen, 2007; Kambara *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2005), y un silenciamiento epigenético de otros genes, como *MLH1* o *MGMT* (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*), responsables de la aparición de tumores MSI-H o MSI-L respectivamente (Jass *et al.*, 2000; Jass *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2005; Mäkinen, 2007; Jass, 2007). Esta variabilidad en la inestabilidad de microsatélites llevó a Young y sus colaboradores a proponer la existencia de un síndrome familiar de CCR independiente de HNPCC, con herencia dominante, localización derecha, edad temprana, mutaciones frecuentes en el gen *BRAF* y un

nivel variable de inestabilidad de microsatélites (MSI-V) (Young *et al.*, 2005). Este síndrome recibió el nombre de “Síndrome de la vía serrada”.

La existencia de varias vías de carcinogénesis colorrectal, implicando varios mecanismos con múltiples genes y varias formas de alteración, además del solapamiento entre estas vías, hacen que el cáncer colorrectal sea una enfermedad muy compleja y heterogénea con varias formas y síndromes. Fearhead propuso que cada tumor es el resultado de un proceso somático progresivo independiente, implicando una serie de cambios genéticos y epigenéticos, y cada uno de ellos hace adquirir al tumor una ventaja evolutiva en el curso de su crecimiento y unas características propias (Fearhead *et al.*, 2002).

## 2.7. SÍNDROMES DE CCR DESARROLLADOS A TRAVÉS DE LAS DISTINTAS VÍAS DE CARCINOGENÉISIS.

En el CCR se conocen las formas esporádicas, familiares y hereditarias (Figura 9).



**Figura 9.** Distribución de las formas y los síndromes del CCR. MAP: Poliposis asociada al gen *MYH*.

### 2.7.1. CCR ESPORÁDICO

La mayoría de los casos diagnosticados del CCR son esporádicos ( $\pm 60\%$ ), detectados en individuos sin ninguna historia familiar de cáncer colorrectal y a una edad bastante avanzada ( $\sim 65-70$  años). Como se ha mencionado anteriormente, estos tumores se originan a partir de microadenomas, desarrollándose en su mayoría ( $\pm 85\%$ ) a través de la vía supresora y mostrando CIN (Lengauer *et al.*, 1997b). Se calcula que los adenomas esporádicos de esta vía tardarían unos 10 años en transformarse en carcinomas (Muto *et al.*, 1975). El 15% restante se desarrolla por la

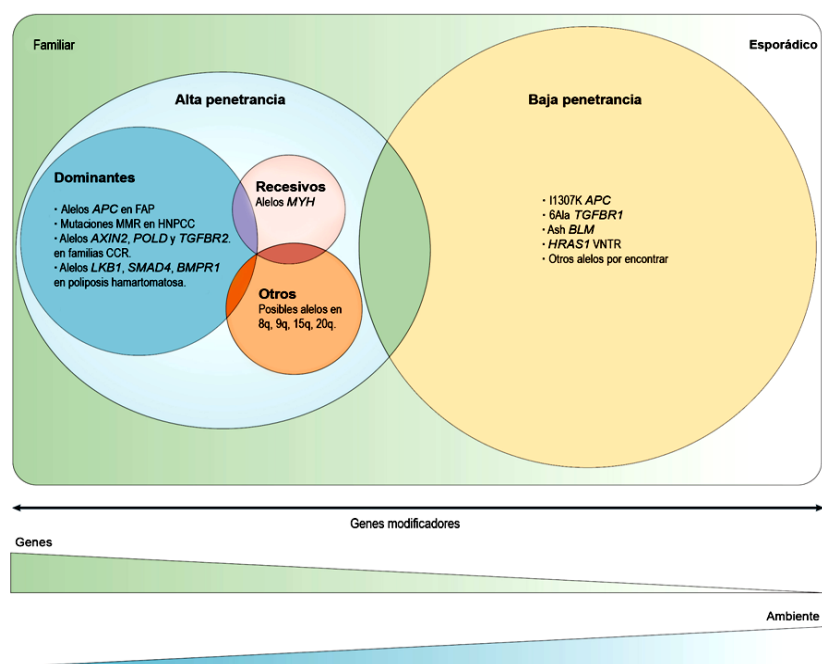
vía mutadora y muestra MSI. La metilación del promotor del gen *MLH1* detectada en aproximadamente el 80% de estos últimos, explicaría solamente una pequeña parte de los tumores esporádicos, mientras que la mayoría sigue sin tener una explicación. En los últimos años se ha postulado que la interacción de las variantes de baja penetrancia con los factores ambientales sería responsable del desarrollo de una gran parte de los tumores de tipo esporádico (Dragani *et al.*, 1996; Balmain, 2002; De la Chapelle, 2004).

### **2.7.2.CCR FAMILIAR**

Se calcula que del 25 al 30% de los casos de cáncer colorrectal son familiares, es decir, presentan antecedentes familiares del cáncer y no un patrón de herencia claro como en el caso de los cánceres hereditarios. Se ha observado que estos pacientes presentan entre 1,5 y 2 veces más de riesgo de presentar CCR que la población general; además, este riesgo aumenta en función del grado de parentesco y el número de familiares afectados (Solera *et al.*, 2007). Se ha sugerido que esta “susceptibilidad multifactorial heredada” al CCR se debe a la suma de los efectos de una serie de variantes de baja penetrancia heredadas, en la que cada una de ellas confiere al paciente un riesgo incrementado de CCR (Lynch *et al.*, 1999; Houlston *et al.*, 2001; Fearnhead *et al.*, 2004; De la Chapelle, 2004; Bodmer, 2006). Actualmente, existe una amplia lista de variantes de susceptibilidad; y muchas de ellas son polimorfismos de base única (*SNP: single nucleotide polymorphism*) detectados en genes con distintas implicaciones en el mecanismo de la carcinogénesis. Aunque el papel exacto de muchas de estas variantes, así como el riesgo relativo al CCR que pueden inducir, sigue generando polémica, su verdadera implicación depende de la base genética en cada población (Houlston *et al.*, 2001; Fearnhead *et al.*, 2004; Bodmer, 2006).

### **2.7.3.CCR HEREDITARIO**

Las formas hereditarias del CCR representan entre el 5 y el 10% de los cánceres colorrectales que se diagnostican. Los pacientes con los síndromes hereditarios presentan mutaciones en la línea germinal en algunos de los genes mayores de predisposición, con una penetrancia alta, lo que les supone un riesgo elevado de desarrollar CCR (Fearon, 1997; Vogelstein *et al.*, 2004). De la Chapelle sugirió que la implicación de los factores ambientales junto a las variantes de baja penetrancia en los síndromes hereditarios es mínima por la existencia de componentes hereditarios de alta penetrancia; sin embargo, esta implicación va en aumento a medida que disminuyen los antecedentes familiares (De la Chapelle, 2004) (Figura 10).



**Figura 10.** Representación esquemática general de la contribución genética y ambiental al CCR. (De la Chapelle, 2004).

Los portadores de alteraciones germinales en los genes mayores de predisposición desarrollan tumores colorrectales a una edad más temprana (10 a 15 años) que los pacientes con CCR esporádico. Este fenómeno ha sido explicado por la **Hipótesis del doble impacto (*Two-hits hypothesis*)** de Knudson. (Knudson, 1971; Knudson, 2002).

Los síndromes hereditarios del CCR se clasifican en dos grupos: **Polipósicos** y **No-polipósicos**, en función de la aparición de pólipos en el colon como fenotipo precanceroso, siendo la FAP y HNPCC los dos síndromes más frecuentes en estos dos grupos, respectivamente.

### 2.7.3.1. CCR HEREDITARIO POLIPÓSICO

#### 2.7.3.1.1. POLIPOSIS ADENOMATOSA

Se caracteriza por la presencia de un número elevado de pólipos adenomatosos en el colon, a una edad bastante temprana (20-30 años aproximadamente), que pueden progresar a carcinomas al no ser tratados quirúrgicamente.

**La poliposis familiar adenomatosa (FAP)** es un síndrome de herencia mendeliana dominante. Este síndrome representa aproximadamente el 1 a 2% de todos los CCRs, con una frecuencia bastante baja: 1 caso entre 10.000 a 20.000 en la población general, pero con una penetrancia de casi 100% (Dunlop *et al.*, 2002). Los pacientes afectados de la FAP desarrollan de 100 a 5000 adenomas (con una media superior a 1000 adenomas), de menos de 1 cm de diámetro a lo largo del colon y en general antes de los 25 años de edad. Cuando estos no son tratados quirúrgicamente, inevitablemente, algunos de ellos se transforman en tumores malignos en la cuarta o la quinta década de la vida (Rustgi, 1994; Calland *et al.*, 2000). Además, estos pacientes

pueden presentar otras manifestaciones extracolónicas como adenomas en el estómago, en el intestino delgado, tumores desmoides, tumores en el sistema nervioso central, carcinomas papilares o foliculares de tiroides, osteomas, quistes epidérmicos, anomalías dentales, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina (CHRPE) y ampolla de Vater (Campbell *et al.*, 1994; Fearnhead *et al.*, 2001).

En el año 1987 se localizó el locus del gen responsable de la aparición de la FAP en el cromosoma 5 (5q21-q22). Este gen recibió el nombre de **APC** (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Bodmer *et al.*, 1987; Groden *et al.*, 1991; Kinzler *et al.*, 1991; Nishisho *et al.*, 1991). Posteriormente, los estudios de asociación genotipo-fenotipo en estos pacientes revelaron que la presencia de las manifestaciones extracolónicas asociadas con la FAP están debidas a mutaciones concretas en el gen **APC** (Bertario *et al.*, 2003).

Además, se han descrito otros síndromes polipósicos como la **FAP atenuada (AFAP)**, con un curso moderado de la enfermedad y también con un patrón de herencia autosómico dominante (Lynch *et al.*, 1990). La **MAP** es una poliposis asociada al gen **MYH** (*Mut Y Homolog to E.coli*), y muestra una herencia autosómica recesiva (Sampson *et al.*, 2003; Sieber *et al.*, 2003; Kemp *et al.*, 2004). El **síndrome de Gardner** es una variante de la FAP, también autosómico dominante y que se diferencia de ésta por la aparición de otras manifestaciones extracolónicas: osteomas del cráneo, huesos largos, tumores desmoides, quistes epidermoides, fibromas, lipomas, tumores de tiroides y adrenales y hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina, además de los adenomas colorrectales (Gardner *et al.*, 1953; Foulkes, 1995). El **síndrome de Turcot** se caracteriza por la aparición de tumores en el sistema nervioso central, principalmente meduloblastomas y también gliomas como tumores asociados a los adenomas colorrectales (Hamilton *et al.*, 1995).

#### 2.7.3.1.2. POLIPOSIS HAMARTOMATOSA

La **poliposis hamartomatosa** se caracteriza por la aparición de pólipos hamartomatosos a lo largo del tracto digestivo. Los pólipos hamartomatosos son pólipos glandulares densos, mostrando una desorganización glandular y la presencia de fibras del músculo liso de la muscular de la mucosa (Spigelman *et al.*, 1989).

El **Síndrome de Peutz-Jeghers** caracterizado por la aparición de múltiples pólipos hamartomatosos gastrointestinales, acompañados de una pigmentación melánica en la zona perioral, las manos, los pies y en ocasiones en la zona peri-anal, muestra una herencia autosómica dominante. Los pacientes pueden presentar además carcinomas pancreáticos, ováricos y testiculares. Las alteraciones responsables de este síndrome han sido localizadas en el gen **LKB1** (*STK11: Serine/Threonine Kinase 11*), implicado en la regulación de la polaridad celular (Lim *et al.*, 2003). La **poliposis juvenil** es un síndrome raro de predisposición al CCR, con herencia

autosómica dominante. Los pólipos observados en este síndrome presentan una histología ligeramente distinta a la observada en el síndrome de Peutz-Jeghres. La aparición de este síndrome estaría causada por mutaciones en los genes **SMAD4** (*SMAD family member 4*) y **BMPRI1A** (*Bone Morphogenetic protein receptor, type IA*), ambos implicados en la vía de señalización de TGFB (Dunlop, 2002; Handra-Luca *et al.*, 2005). El **Síndrome de Cowden** tiene un patrón de herencia autosómico dominante. Además de los pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal, el síndrome de Cowden se caracteriza por hamartomas cutáneos, de tiroides y de mama. En algunas ocasiones los pacientes pueden presentar otras manifestaciones en el sistema nervioso central como gangliocitomas displásicos cerebrales, macrocefalias, la enfermedad de Lhermitte-Duclos y retraso mental (Marsh *et al.*, 1999; Agrawal *et al.*, 2006). El **Síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley** comparte con el síndrome de Cowden la mayoría de las características clínicas y genéticas. Igual que los otros síndromes de la poliposis hamartomatosa, Bannayan-Ruvalcaba-Riley presenta un patrón de herencia autosómico dominante y los pacientes muestran pólipos hamartomatosos a lo largo del tracto gastrointestinal. Éstos presentan además lipomas cutáneos y hemangiomas, malformación vascular, macrocefalia, retraso mental, adenomas en el tiroides y pigmentación parcheada en el pene. Las alteraciones responsables de la aparición del síndrome de Cowden así como el síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley han sido identificadas en el gen **PTEN** (*Phosphatase and Tensin Homolog*), que codifica una fosforilasa implicada en la ruta AKT/PKB, y responsable del detenimiento del ciclo celular en la fase G1 y la inducción de la apoptosis. (Marsh *et al.*, 1999).

### **2.7.3.2. CCR HEREDITARIO NO-POLIPÓSICO**

#### **2.7.3.2.1. SÍNDROME DE LYNCH O HNPCC**

La primera descripción de una familia portadora del síndrome de Lynch fue realizada en el año 1913 por el patólogo Aldred Warthin (Warthin, 1913). Años más tarde, Lynch y Krush volvieron a estudiar la misma familia, que recibió el nombre de “Familia G” y que permitió caracterizar una nueva entidad de cáncer colorrectal, conocida desde entonces como Síndrome de Lynch y años más tarde como (HNPCC: *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) (Lynch *et al.*, 1971; Boland *et al.*, 1984). El síndrome de Lynch presenta un patrón de herencia autosómica dominante y se estima que tiene una frecuencia del 1 al 5% del total de los CCRs en la población española (Piñol *et al.*, 2004), aunque existen discrepancias en las cifras debido al método empleado para el diagnóstico y el reconocimiento de los pacientes (Dunlop, 2002; De la Chapelle, 2004).

El síndrome de Lynch se caracteriza por una alta penetrancia, pero menor que la FAP (~ 85-90%). Presentan un número bajo de adenomas, inicio temprano del CCR (~ 45 años de edad); casi el 70% de los tumores desarrollados presentan una localización proximal, tumores

colorrectales sincrónicos y metacrónicos frecuentes, los tumores son pobremente diferenciados, de tipo anillo de sello o con diferenciación medular, presentan linfocitos infiltrantes y la reacción “Crohn-like” tumoral. El pronóstico de los pacientes HNPCC es mejor que los pacientes con CCR esporádico. Por otra parte, estos pacientes presentan un riesgo incrementado de desarrollar tumores extracolónicos, especialmente en el endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, tracto hepatobiliar, páncreas, cerebro, uréter y pelvis renal (Lynch *et al.*, 1991; Lynch *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 2003). Los tumores de mama por su parte no están considerados como asociados al síndrome de Lynch, aunque en algunas familias HNPCC se relacionaron éstos con las manifestaciones extracolónicas de la enfermedad (Risinger *et al.*, 1996). Vasen y sus colaboradores observaron que el riesgo de desarrollar el cáncer de mama no aumenta en los pacientes con HNPCC, sino que aparece a una edad más temprana. Este hecho ha sido explicado por la acumulación de las alteraciones en los genes del MMR, responsables del HNPCC y también del cáncer del mama, lo que aceleraría el mecanismo de la tumorigénesis de mama y la aparición más temprana de este tipo de tumores (Vasen *et al.*, 2001). Basándose en el riesgo de padecer tumores extracolónicos, el síndrome de Lynch se puede dividir en dos tipos:

- **Síndrome de Lynch de tipo I:** Cuando los pacientes presentan riesgo de desarrollar únicamente tumores colorrectales.
- **Síndrome de Lynch de tipo II:** Cuando los pacientes presentan riesgo de desarrollar además de los tumores colorrectales cánceres extracolónicos, especialmente en el endometrio, estómago, intestino delgado, vías urinarias y ovario (Lynch *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1993). Aarnio y sus colaboradores estimaron que la incidencia acumulada de tumores extracolónicos en los pacientes HNPCC a los 70 años de edad era del 82% para los tumores colorrectales, 60% para los endometriales, 13% para los gástricos y 12% para los ováricos; mientras que los demás tumores de intestino, cerebro, tracto biliar y vías urinarias, esta incidencia era solamente de 2 a 4% (Aarnio *et al.*, 1999). No obstante el tipo de tumores extracolónicos desarrollados así como su verdadera incidencia es casi propio a cada familia HNPCC (Lynch *et al.*, 1999; Lynch *et al.*, 2006).

A pesar de que los trabajos sobre el síndrome de Lynch se remontan a principios del siglo pasado, los primeros criterios para poder diagnosticar los portadores fueron formulados hace sólo dos décadas, basándose en la historia familiar del paciente. Así, en 1991, gracias a una colaboración internacional (ICG-HNPCC: *International Collaborative Group on Hereditary non-polyposis colorectal cancer*), se elaboraron unos criterios clínicos con el fin de facilitar y unificar el diagnóstico de los pacientes HNPCC, bajo el nombre de **Criterios de Ámsterdam I** (Vasen *et al.*, 1991). Años más tarde, con el fin de poder incluir las manifestaciones extracolónicas asociadas a HNPCC y así incorporar más familias en el diagnóstico, en el décimo



encuentro del ICG-HNPCC de 1998 se propusieron unos nuevos criterios que recibieron el nombre de **Criterios de Ámsterdam II** (Vasen *et al.*, 1999). Sin embargo, seguían existiendo dificultades en el diagnóstico y un gran número de pacientes no cumplían estos criterios. Por otra parte, los análisis genéticos de estos tumores revelaron que la mayoría presentaban MSI. Esta característica fue aprovechada por el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos para proponer, en 1997, unos nuevos criterios de diagnóstico basados, en este caso, sobre las características moleculares y patológicas de los tumores además de la historia familiar de los pacientes. Estos criterios recibieron el nombre de **Criterios de Bethesda** (Rodríguez-Bigas *et al.*, 1997). Asimismo, fue Boland y sus colaboradores quienes recomendaron utilizar un panel de 5 microsatélites (**BAT25**, **BAT26**, **D2S123**, **D5S346** y **D17S250**) con el fin de determinar el nivel de inestabilidad de microsatélites para seleccionar aquellos tumores que serán sometidos a una búsqueda de mutaciones germinales en los genes del sistema MMR (Boland *et al.*, 1998). De este modo, los tumores se pueden clasificar en:

- **MSI-H:** (*MSI-High*) cuando el tumor presenta 2 o más microsatélites inestables de los 5 analizados ( $\geq 40\%$ ).
- **MSI-L:** (*MSI-Low*) cuando el tumor presenta un microsatélite inestable de los 5 analizados ( $< 40\%$ ).
- **MSS:** (*MSI-Stable*) cuando ninguno de los 5 microsatélites analizados muestra inestabilidad.

Se calcula que aproximadamente el 80% de los tumores HNPCC y alrededor del 15% de los tumores esporádicos son MSI-H. La inestabilidad de los microsatélites se observa también en los tumores de estómago, de endometrio y de mama (Ionov *et al.*, 1993; Risinger *et al.*, 1993; Rhyu *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 2000). Posteriormente, en el año 2004, los criterios de Bethesda se volvieron a actualizar con el fin de ampliar el uso de los microsatélites. Esta nueva revisión fue denominada: **Criterios de Bethesda Revisados** (Umar *et al.*, 2004). Los criterios de Ámsterdam I, Ámsterdam II, Bethesda y Bethesda revisados se resumen en la Tabla 3.



## Criterios de diagnóstico de HNPCC.

### Ámsterdam I (Vasen *et al.*, 1991)

- Al menos 3 familiares afectados de CCR, excluyendo la FAP y:
- Uno de los familiares es pariente de primer grado de los otros dos.
- Al menos dos generaciones sucesivas afectadas de CCR.
- Al menos uno de los casos es diagnosticado antes de los 50 años.

### Ámsterdam II (Vasen *et al.*, 1999)

- Al menos 3 familiares afectados de CCR u otro tumor extracolónico asociado a HNPCC verificado por un examen anatomopatológico, excluyendo la FAP y:
- Uno de los familiares es pariente de primer grado de los otros dos.
- Al menos dos generaciones sucesivas afectadas de CCR.
- Al menos uno de los casos es diagnosticado antes de los 50 años.

### Bethesda (Rodríguez-Bigas *et al.*, 1997)

- Individuos con cáncer cuyas familias cumplen los criterios de Ámsterdam.
- Individuos con 2 cánceres relacionados a HNPCC, incluyendo CCR sincrónicos, metacrónicos o extracolónicos asociados a HNPCC.
- Individuos con CCR y un pariente de primer grado con CCR y/o cáncer extracolónico asociado a HNPCC y/o adenoma colorrectal. Uno de los cánceres tiene que haber sido diagnosticado antes de los 45 años, o antes de los 40 años en el caso del adenoma.
- Individuos con CCR o cáncer de endometrio diagnosticados antes de los 45 años.
- Individuos con CCR proximal con patrón indiferenciado, antes de los 45 años
- Individuos con CCR de células en anillo-sello, antes de los 45 años.
- Individuos con adenomas colorrectales diagnosticados antes de los 40 años.

### Bethesda Revisados (Umar *et al.*, 2004)

- Análisis de MSI en los tumores detectados en los pacientes con las siguientes situaciones:
- CCR diagnosticado en pacientes antes de los 50 años
- Presencia de CCR sincrónico o metacrónico, u otro tumor asociado a HNPCC independientemente de la edad.
- CCR con MSI-H diagnosticado histológicamente antes de los 50 años.
- CCR diagnosticado en un paciente con al menos un familiar de primer grado afectado con HNPCC o un tumor asociado a HNPCC, antes de los 50 años.
- CCR diagnosticado en 2 o más familiares de primer o segundo grado, independientemente de la edad.

**Tabla 3.** Resumen de los diferentes criterios de diagnóstico de HNPCC: Ámsterdam I, II, Bethesda y Bethesda Revisados.

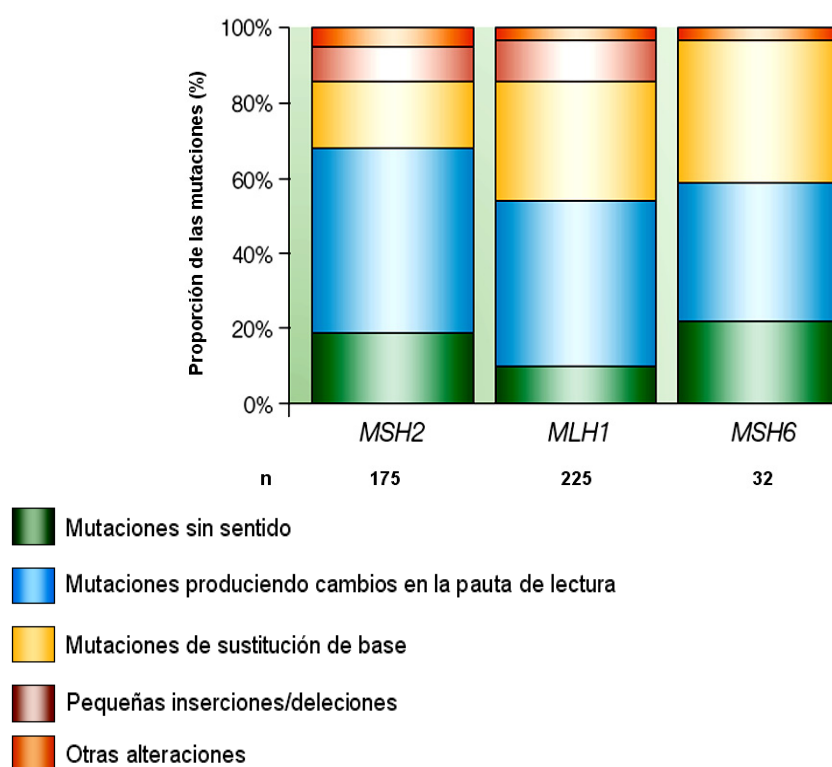
A pesar de los criterios establecidos sigue existiendo polémica en torno a la eficacia de los métodos utilizados para el diagnóstico de HNPCC, por la cantidad de los pacientes que no cumplen estos criterios; y también en torno a la sensibilidad de los microsatélites utilizados para

determinar el nivel de MSI. Efectivamente, se ha observado que BAT26 (localizado en el intrón 5 del gen *MSH2*) es el marcador más sensible para detectar los tumores MSI-H. Estos últimos presentan una serie de características clínicas y patológicas propias de esta entidad, mientras que muchos autores consideran los tumores MSI-L y MSS como fenotipos similares y sin ninguna implicación patológica (Boland *et al.*, 1998; Thibodeau *et al.*, 1998; Laiho *et al.*, 2002; Tomlinson *et al.*, 2002). Por lo tanto, se ha recomendado utilizar un panel adicional de microsatélites con el fin de poder diferenciar a los tumores estables de los que presentan una baja inestabilidad de microsatélites (Boland *et al.*, 1998). De la misma forma, algunos autores han propuesto que el análisis del marcador BAT26 únicamente es suficiente para la detección de los tumores MSI-H (Loukola *et al.*, 2001). La inmunohistoquímica es otra técnica propuesta, sola o combinada con el análisis de MSI, para el diagnóstico de los tumores MSI-H mediante la tinción de los tejidos tumorales, puesto que casi la totalidad de estos tumores muestran una pérdida de expresión de las proteínas MLH1 o MSH2 del sistema MMR (Thibodeau *et al.*, 1998). A pesar de las críticas hacia esta técnica por su coste y también por la confusión que puede crear, por ejemplo, en el caso de los tumores MSI-H esporádicos causados por la metilación del promotor del gen *MLH1* más que por las mutaciones germinales en los genes del MMR (Lynch *et al.*, 2006), algunos autores la consideran como el criterio de diagnóstico más exacto para detectar el síndrome de Lynch (De la Chapelle, 2004; Lynch *et al.*, 2006), siendo la técnica más fiable después de analizar el nivel de MSI en los tumores de los pacientes que cumplen los criterios de Bethesda (Vasen *et al.*, 2005). En este sentido, y con el fin de diferenciar los tumores MSI-H pertenecientes a HNPCC de los esporádicos, se ha propuesto el análisis de la mutación V599E en el gen *BRAF* en los tumores MSI-H, puesto que su presencia es característica de los tumores esporádicos sin mutaciones germinales en *MLH1* y *MSH2*, mientras que su ausencia indicaría que estos tumores MSI-H pertenecen a HNPCC (Domingo *et al.*, 2005; Jass, 2007).

El HNPCC presenta un patrón de herencia autosómico dominante y ha sido asociado a mutaciones germinales principalmente en 4 genes del sistema MMR: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* (Lynch *et al.*, 2003; De la Chapelle, 2004; Lynch *et al.*, 2006), aunque se estima que las alteraciones de *MLH1* y *MSH2* son responsables de alrededor del 90% de los casos, y los de *MSH6* de casi el 10% de los casos; mientras que en *PMS2* se han identificado pocas alteraciones (Lynch *et al.*, 2003). En las familias que no cumplen los criterios de Ámsterdam, llamadas “familias HNPCC-like”, la proporción de las mutaciones encontradas en los genes MMR es mucho menor (8-30%) (Lynch *et al.*, 1999). Por otro lado, se han identificado algunas familias cumpliendo los criterios de Ámsterdam pero sin mutaciones identificables en los genes MMR. Al observar que este grupo de pacientes presentaba otras características, como un riesgo incrementado de tumores colorrectales, pero menor que en las familias HNPCC tradicionales, un riesgo disminuido de presentar tumores extracolónicos y una edad avanzada al diagnóstico ( $\pm 60$

años), los autores propusieron que esta entidad de CCR debe considerarse independiente del síndrome de Lynch y postularon llamarla: “CCR familiar de tipo X”, nombre que cambiaron después a “CCR familiar de tipo indeterminado” con el fin de evitar la confusión con las formas de herencia ligadas al cromosoma X (Lindor *et al.*, 2005; Lynch *et al.*, 2006).

Los pacientes con HNPCC son portadores de una mutación germinal en uno de los genes MMR, por lo tanto, para perder su actividad funcional, estos genes necesitan un segundo suceso a nivel somático, en el tejido diana, que suele ser una mutación puntual o una pérdida de heterocigosidad (LOH). Estas mutaciones en *MLH1* y *MSH2* se distribuyen a lo largo de la secuencia del gen sin puntos calientes (Peltomäki *et al.*, 1997; De la Chapelle, 2004), aunque, se ha sugerido que la pérdida de un solo alelo podía llevar a la función incompleta de estos genes por el fenómeno de la haploinsuficiencia (Quon *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2008). Actualmente, existen más de 400 mutaciones descritas en la base de datos del *International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer mutation database* (<http://www.nfdht.nl>) que han sido detectadas en más de 500 familias a través de todo el mundo. Estas mutaciones se distribuyen de la siguiente manera:



**Figura 11.** Distribución de las alteraciones de los genes MMR en HNPCC. (De la Chapelle, 2004).

A diferencia de la FAP, las manifestaciones extracolónicas en HNPCC no están relacionadas con mutaciones concretas en los genes MMR. Sin embargo, se ha descrito que la mayoría de los pacientes con tumores extracolónicos son portadores de mutaciones en el gen

*MSH2*, en comparación con los portadores de mutaciones en *MLH1*, que suelen presentar una gran proporción de tumores colorrectales y menos tumores extracolónicos (Jäger *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998; Lynch *et al.*, 2006). Las mutaciones en *MSH6* se han asociado con una forma atenuada de HNPCC que presenta una baja penetrancia, edad avanzada al diagnóstico, tumores estables o con baja inestabilidad de microsatélites y tumores endometriales y ováricos (Miyaki *et al.*, 1997; Wijnen *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999). La información disponible hasta el momento sobre las consecuencias fenotípicas de la alteración del gen *PMS2* es muy limitada y variable. Se ha descrito que sus mutaciones se relacionan con una penetrancia baja, una edad temprana de la aparición de la enfermedad y la aparición de tumores cerebrales, además de otras características clínicas variables (Lynch *et al.*, 2006; Senter *et al.*, 2008).

En HNPCC se ha identificado una serie de mutaciones recurrentes y ancestrales. Las mutaciones recurrentes son las que se observan repetidamente en familias no emparentadas y con una frecuencia más alta, como consecuencia del establecimiento de una nueva mutación (*de novo*). Una de las mutaciones recurrentes más citadas en la bibliografía es una transversión A—T situada en el lugar de *splicing* del intrón 5 del gen *MSH2*, denominada (c.942 + 3A – T). Esta mutación lleva a una exclusión del exon 5 durante la transcripción y por consiguiente una pérdida de expresión de la proteína MSH2. Se ha descrito que dicha mutación aparecería, en esta zona susceptible, como resultado del deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN en una secuencia microsatelitífera que codifica para 26 adeninas. Esta mutación ha sido detectada en varias familias a través del mundo y se estima que puede ser responsable de 5 a 10% de los casos HNPCC (De la Chapelle, 2004; Lynch *et al.*, 2006).

Una mutación ancestral o fundadora es aquella que es introducida por un individuo en una población pequeña con cierto grado de aislamiento y de endogamia y que, tras una expansión poblacional rápida, se establece y aumenta su frecuencia en la población. En el síndrome de Lynch se han identificado varias mutaciones fundadoras en diferentes poblaciones como responsables de la aparición de la enfermedad, entre ellas la delección del exon 16 del gen *MLH1* en la población finlandesa, cuya edad estimada es de 1000 años aproximadamente, y se calcula que puede ser responsable de más del 50% de los casos HNPCC (Nyström-Lahti *et al.*, 1995). En la población norteamericana se ha descrito la delección de los exones 1 al 6 del gen *MSH2*, cuyo origen es una familia inmigrante alemana de hace más de 3 siglos, y que se ha expandido actualmente a más de 14 estados (Lynch *et al.*, 2004). En España, se ha descrito recientemente la mutación 2063T – C, en el exon 13 del gen *MSH2*, como responsable de la aparición del síndrome de Lynch en cinco familias del norte de la isla de Tenerife, como resultado del aislamiento de esta población durante cerca de 500 años. Esta mutación origina el cambio de una metionina por una arginina en el codon 688, correspondiendo a una zona altamente conservada, responsable de la actividad ATPasa de la proteína (Medina-Arana *et al.*, 2006).

La acción de las variantes de baja penetrancia en HNPCC no está todavía bien definida. Jones y colaboradores observaron que los portadores del polimorfismo G72C en el exon 4 del gen *TP53*, responsable de la sustitución de una arginina por una prolina, desarrollaban HNPCC trece años antes que los homocigotos normales (Jones *et al.*, 2004); sin embargo otros estudios no han sido capaces de encontrar esta asociación (Sotamaa *et al.*, 2005; Talseth *et al.*, 2007).

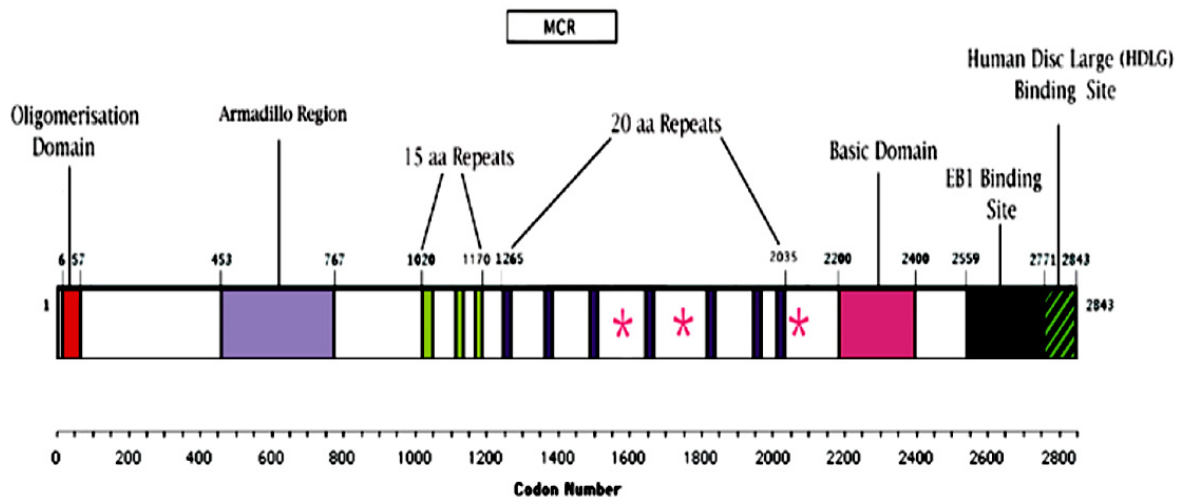
Por otra parte, se ha descrito una variante rara de HNPCC que es el **síndrome de Muir-Torre**, presenta igualmente un patrón de herencia autosómico dominante, y se caracteriza por la aparición de múltiples adenomas y carcinomas sebáceos cutáneos, hiperplasia sebácea, queratocantomas, adenocarcinomas viscerales principalmente colorrectales, endometriales, urogenitales y gastrointestinales a una edad temprana (Ponti *et al.*, 2005).

## 2.8. GENES IMPLICADOS EN LA TUMOROGÉNESIS COLORRECTAL

### 2.8.1. VÍA SUPRESORA

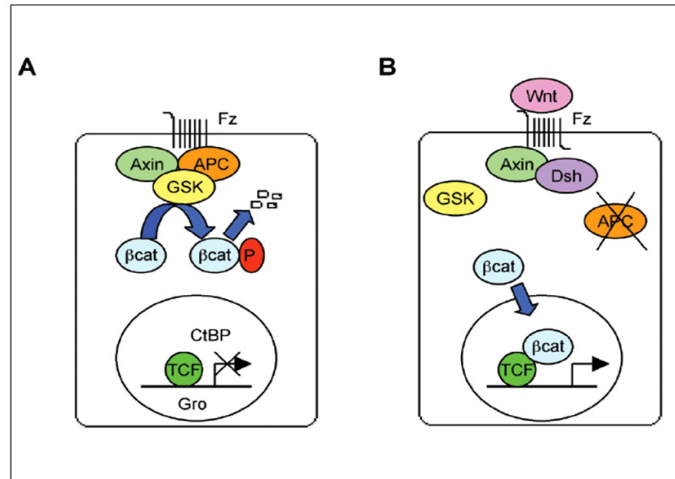
#### 2.8.1.1. *APC*

El gen supresor de tumores *APC* mapea en el cromosoma 5 (5q21-q22), consta de 16 exones, y produce un transcrito de 10.701 pb. Este gen codifica para una macroproteína constituida de 2843 aminoácidos y un peso de ~ 312 KDa (*Kilo Daltons*) en su isoforma más común. El exon 15 se compone de 6574 pb y representa más del 75% de la secuencia codificante del gen; este exon además es donde se han descrito más alteraciones a nivel somático y germinal (Fearnhead *et al.*, 2001). La proteína APC comprende varios dominios y sitios de interacción con otras proteínas, y está implicada en varios mecanismos celulares tales como la adhesión y migración celulares, la segregación cromosómica, la transducción y la apoptosis. En el extremo amino-terminal (N) se encuentra el dominio de oligomerización, permitiendo al gen la formación de homodímeros, además de una región armadillo responsable de la interacción con la subunidad reguladora B56 de la proteína fosfatasa 2A, implicada en la vía de señalización WNT (*Wingless signaling pathway*) y también en la migración celular. En el extremo C-terminal se encuentra una zona de unión a la proteína EB1, responsable de mantener la conexión entre los microtúbulos del huso mitótico y los cromosomas metafásicos, y por lo tanto responsable de la estabilidad cromosómica (Rehberg *et al.*, 2002), por lo que las alteraciones en esta zona son responsables de la aparición de CIN (Fodde *et al.*, 2001; Tighe *et al.*, 2004). En el extremo C-terminal además se encuentra el dominio HDLG (*human homologue of the Drosophila discs large*), responsable de la regulación del citoesqueleto. La Figura 12 representa la distribución de los dominios funcionales de la proteína APC.



**Figura 12.** Distribución de los dominios funcionales de la proteína APC. (Fearnhead *et al.*, 2001).

El papel supresor de la proteína APC, y el más importante, consiste en su implicación en la vía de señalización WNT, como reguladora de la Beta-catenina. En medio de la proteína existen 2 dominios: el primero incluyendo 3 repeticiones de 15 aminoácidos (entre los codones 1020 y 1169), representa el lugar de unión con la  $\beta$ -catenina, y el segundo incluye 7 repeticiones de 20 aminoácidos (entre los codones 1262 y 2033), y es responsable de la regulación de ésta. En ausencia de la señal “Wnt”, la  $\beta$ -catenina se une a APC y a axina, activando su fosforilación mediante la glucogeno sintetasa kinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), marcando de esta manera su posterior degradación por proteólisis. En presencia de señal la  $\beta$ -catenina no se fosforila y por lo tanto no se degrada, lo que provoca su acumulación en el citoplasma. Este aumento del nivel de la  $\beta$ -catenina puede deberse también a la inactivación del gen *APC* o por mutaciones en el propio gen  *$\beta$ -catenina*. A nivel del núcleo, la  $\beta$ -catenina se une al factor de transcripción TCF (*T Cell Factor*), especialmente con TCF4 que es el factor de transcripción más frecuentemente expresado en las células epiteliales intestinales. Esta unión a su vez activa la transcripción de otros genes diana, como el oncogén *c-MYC* (*v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog of avian*) y la ciclina D1 (*CCND1*), ambos responsables de la regulación del ciclo celular (Fearnhead *et al.*, 2001; Knudsen *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2004) (Figura 13). Otro papel importante de la proteína APC es la adhesión celular regulando la unión de la  $\beta$ -catenina con CDH1 (e-cadherina) y también la migración ordenada de las células desde la base de la cripta hasta el ápex intestinal, por lo que las alteraciones del gen *APC* pueden provocar una acumulación de células y por consiguiente un principio de formación de pólipos (Aoki *et al.*, 2007).



**Figura 13.** Papel de *APC* en la vía “WNT” en presencia y en ausencia de la señal “Wnt”. (Cabrera *et al.*, 2005).

Casi el 95% de las mutaciones germinales en *APC* son mutaciones sin sentido originando una proteína truncada, o mutaciones puntuales causando un cambio en la pauta de lectura, originando una proteína no funcional. Se ha descrito que estas mutaciones se reparten entre los codones 200 y 1600, y afectan especialmente a los codones 1061 y 1309; por lo que las funciones de la adhesión y migración celulares y las que implican a la  $\beta$ -catenina se ven afectadas. En cuanto a las mutaciones somáticas, suelen ocurrir con una frecuencia entre 60 y 85% en los tumores colorrectales esporádicos y, en la mayoría de los casos, son de tipo LOH originando una proteína no funcional. Estas mutaciones afectan especialmente a la zona comprendida entre los codones 1286 y 1513, llamada **MCR** (*Mutation Cluster Region*), donde se sitúan dos puntos calientes, correspondiendo a los codones 1309 y 1450 (Fearnhead *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2007). Al ser un gen supresor la inactivación de ambos alelos de *APC* en las familias FAP sigue la hipótesis “*Two-hits*” de Knudson. Sin embargo, se ha demostrado que las mutaciones germinal y somática no son independientes, sino que la posición de la primera mutación en la línea germinal determina el lugar donde ocurrirá la segunda mutación en la línea somática. Así se ha observado que cuando la primera mutación (germinal) ocurre en la zona incluida entre los codones 1194 y 1392, la segunda mutación (somática) suele ser de tipo LOH; y cuando la primera mutación ocurre fuera de esta zona, la segunda mutación suele ocurrir en el MCR y origina una proteína truncada (Lamlum *et al.*, 1999).

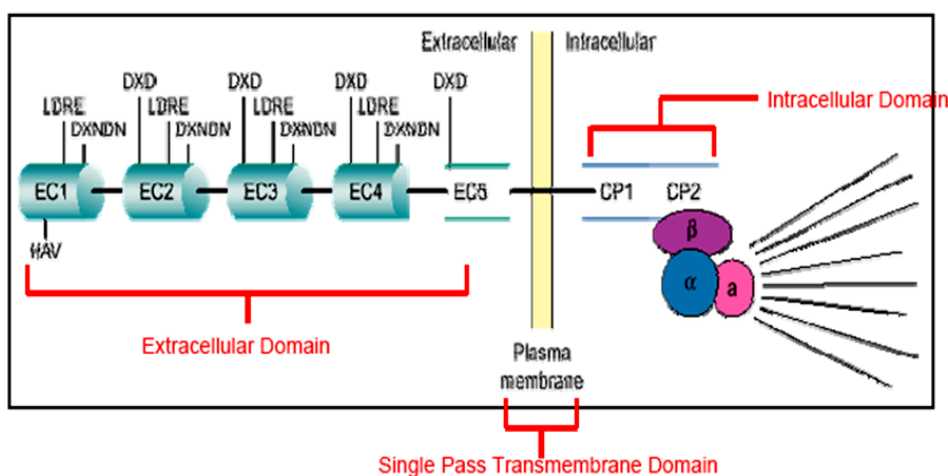
Por otra parte, los estudios de asociación genotipo-fenotipo revelan que algunas formas de la FAP, además de las manifestaciones extracolónicas asociadas a ésta, están relacionadas con mutaciones concretas en el gen *APC* (Bertario *et al.*, 2003). De este modo, se ha observado que los pacientes con la versión severa de la enfermedad son portadores de mutaciones entre los codones 1250 y 1464, o en los codones 233, 486 y 499. Los pacientes con la FAP atenuada son generalmente portadores de mutaciones en los extremos 3’ o 5’ del gen, o en el lugar de *splicing*



del exon 9. Por otra parte, CHRPE se produce únicamente en los pacientes portadores de mutaciones entre los codones 457 y 1444, y los tumores desmoides se originan en aquellos pacientes que presentan mutaciones especialmente entre los codones 1403 y 1578, mientras que las demás manifestaciones extracolónicas asociadas a la FAP suelen aparecer en los pacientes con mutaciones entre 1445 y 1578 o entre los codones 1395 y 1493 (Fearnhead *et al.*, 2001; Bertario *et al.*, 2003).

### 2.8.1.2. *CDH1*

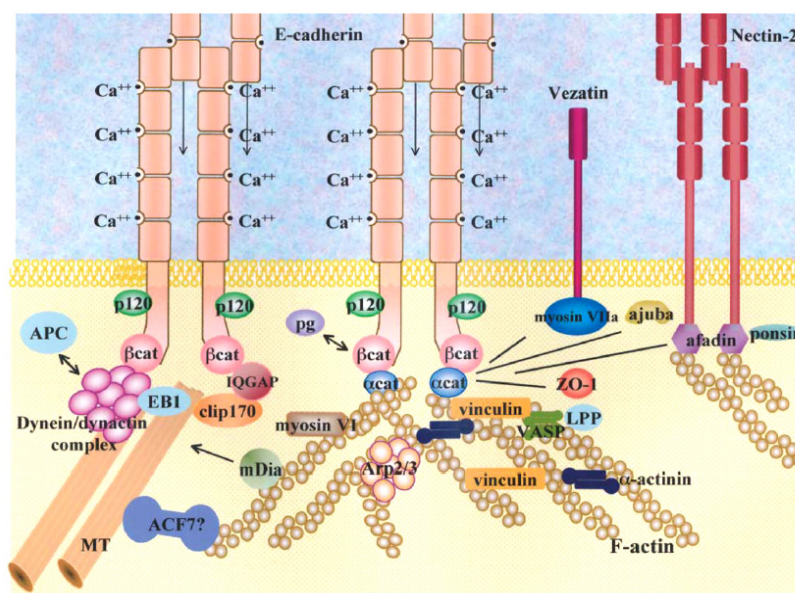
El gen supresor *CDH1* (*Epithelial-cadherin*) mapea en el cromosoma 16 (16q22.1), se compone de 16 exones y produce un transcrito de 4875 pb, codificando para una glicoproteína transmembrana de uniones hemofílicas mediadas por el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), responsable de la adhesión célula-célula y del establecimiento y mantenimiento de la polaridad apicobasal de éstas. *CDH1* pertenece a la superfamilia de las cadherinas implicadas en la histogénesis y la embriogénesis, y en el mantenimiento de la estructura de los tejidos sólidos, especialmente la adhesión y la interacción celular (Halbleib *et al.*, 2006). La E-cadherina se encuentra en el tejido epitelial, la P-cadherina se encuentra en el tejido placentario y la N-cadherina está presente en las células nerviosas. La proteína E-cadherina se compone de unos 882 residuos y un peso de  $\sim 97,5$  KDa. El extremo C-terminal de la proteína corresponde al dominio intracelular citoplásmico implicado en la interacción con las cateninas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ , interactuando con el citoesqueleto. El extremo N-terminal, extracelular, se compone de 5 dominios, 4 de ellos idénticos con un dominio de adhesión de tipo HAV (Histidina-Alanina-Valina) que presentan el sitio de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ , responsable de conferir rigidez a la parte extracelular de la proteína (Perez-Moreno *et al.*, 2003; Halbleib *et al.*, 2006) (Figura 14).



**Figura 14.** Estructura y dominios de la E-cadherina. De Internet (*W. H. Freeman and Company*).



Las moléculas de cadherina tienen la capacidad de unirse a otras moléculas de cadherina de otras células con las mismas características. Estas uniones adherentes son dependientes de calcio y se pueden realizar entre las moléculas adyacentes de células laterales formando una unión cis, o entre moléculas opuestas de células vecinas, formando una unión trans (Perez-Moreno *et al.*, 2003; Halbleib *et al.*, 2006) (Figura 15). La fuerza de esta unión puede cambiar fácilmente en función de la necesidad de la célula y como respuesta a los múltiples factores de crecimiento y otras señales emitidas, sin afectar a la adhesión de la célula con las otras células de su entorno (Gumbiner, 2000; Perez-Moreno *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2004). Por otra parte, esta fuerza de unión está determinada por el nivel de cadherina expresado, mientras que el tipo de cadherina determina la especificidad de la interacción celular (Gumbiner, 2000; Nelson *et al.*, 2004).



**Figura 15.** Interacción de la E-cadherina con otras proteínas. (Perez-Moreno *et al.*, 2003).

Durante el mecanismo de la carcinogénesis, sin embargo, esta adhesión puede resultar alterada debido a varias causas: cambios en el citoesqueleto, alteración de una de las proteínas implicadas en la formación de las uniones, o una disminución en la fuerza de adhesión entre las células. Estos cambios en la adhesión celular favorecerían la migración de las células tumorales llevando a la invasión de otros tejidos y a la aparición de metástasis (Conacci-Sorrell *et al.*, 2002; Hirohashi *et al.*, 2003). El gen *CDH1*, por su parte, puede sufrir varias alteraciones que han sido detectadas en diferentes neoplasias, y en etapas avanzadas del desarrollo tumoral, coincidiendo con la transición del adenoma diferenciado al carcinoma invasivo (Perl *et al.*, 1998).

Las mutaciones germinales en este gen han sido relacionadas con el síndrome hereditario de susceptibilidad al cáncer gástrico (HDGC) y también con el cáncer de mama de tipo lobular (Lynch *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Masciari *et al.*, 2007). Además se ha demostrado que las mujeres pertenecientes a las familias HDGC presentan hasta el 40% más de riesgo a padecer

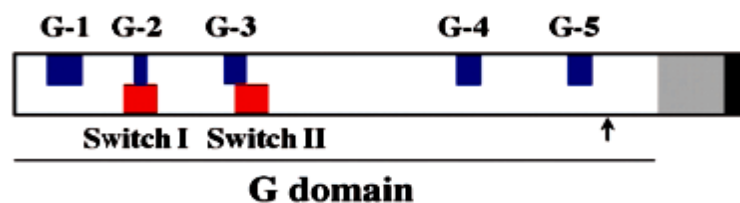
cáncer de mama lobular en comparación con la población general (Pharoah *et al.*, 2001). Las alteraciones de *CDHI* han sido igualmente relacionadas con algunos cánceres ginecológicos y también de tiroides (Risinger *et al.*, 1994; Fujimoto *et al.*, 1997; Mitselou *et al.*, 2007). El gen *CDHI* puede igualmente sufrir deleciones; sin embargo éstas se han detectado en los mismos tumores donde aparece *CDHI* mutado, puesto que este gen es supresor de tumores y por lo tanto necesita el silenciamiento de ambos alelos de acuerdo con la hipótesis de “Two-hits” de Knudson (Oliveira *et al.*, 2004). Por otra parte, se ha descrito que la disminución de expresión de la E-cadherina en muchas neoplasias se debe fundamentalmente a la metilación del promotor del gen *CDHI* (Strathdee, 2002; Hirohashi *et al.*, 2003), lo que ha sido detectado en el cáncer de mama (Cheng *et al.*, 2001; Caldeira *et al.*, 2006), de pulmón (Shimamoto *et al.*, 2004; Nakata *et al.*, 2006) y nasofaríngeo (Tsao *et al.*, 2003). En el cáncer colorrectal, sin embargo, existen resultados contradictorios sobre la implicación de la metilación del promotor de *CDHI* en el mecanismo de la tumorigénesis. Wheeler y colaboradores detectaron el promotor de *CDHI* metilado en el 46% de los tumores y sugirieron que era el mecanismo responsable de la reducción de la expresión de la E-cadherina en estos tumores (Wheeler *et al.*, 2001). En otro estudio, se detectó la metilación del promotor de *CDHI* en el 93% de las muestras procedentes de pacientes con colitis ulcerosa, con displasia, considerada como un factor de riesgo para el cáncer colorrectal (Azarschab *et al.*, 2002). Sin embargo, otros estudios no han encontrado ninguna relación entre la bajada de expresión y la metilación del promotor de *CDHI* sugiriendo la existencia de otro mecanismo responsable de tal evento (Xu *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006a). Por otro lado, la metilación del promotor de *CDHI* se ha detectado en los tumores de pacientes con HDGC, portadores de mutaciones germinales en un alelo de *CDHI*, sugiriendo que la metilación puede igualmente actuar como segundo evento para silenciar ambos alelos del gen de acuerdo con la hipótesis de Knudson (Grady *et al.*, 2000).

### 2.8.1.3. *KRAS2*

El proto-oncogen *KRAS2* (*v-ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) se descubrió en humanos en células (LX-1) de carcinoma de pulmón, e identificado como homólogo del oncogen aislado a partir del virus Kirsten de sarcoma de rata (Der *et al.*, 1982). Este gen pertenece a la superfamilia de proteínas GTPasas monoméricas (GTP: guanósín trifosfato), cuya función es la transducción intracelular de las señales extracelulares, responsables de la activación de mecanismos como la proliferación, la diferenciación y la adhesión celulares, o la apoptosis. Los genes más estudiados de la familia RAS son *KRAS*, *HRAS* (*v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*) y *NRAS* (*Neuroblastoma Ras viral (v-ras) oncogene homolog*). Estos 3 genes presentan casi el 85% de homología entre sí y mapean en distintos cromosomas, con diferentes niveles de expresión según el tejido y durante las diferentes fases del desarrollo. Asimismo, la alteración de cada uno de estos 3 genes ha sido detectada en un tipo tumoral

distinto, siendo *KRAS2* el oncogen que sufre más mutaciones en los tumores humanos (Crespo *et al.*, 2000; Downward, 2003; Kranenburg, 2005).

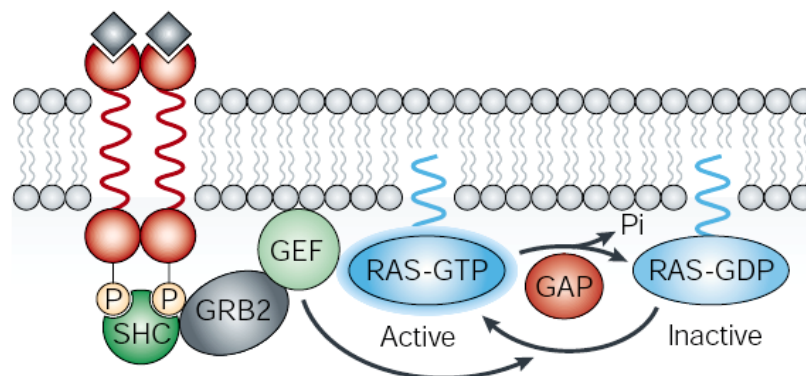
*KRAS2* mapea en el cromosoma 12 (12p12.1), consta de 6 exones y produce un transcrito de 5419 pb, codificando para una proteína de 189 residuos y un peso aproximado de 21,7 KDa. En el exon 5 existe un sitio de *splicing*, lo que genera 2 isoformas: KRASA y KRASB, que se diferencian en la región C-terminal. La proteína KRAS incluye un dominio conservado, en el extremo N-terminal, entre los residuos 1 y 165, llamado el dominio G, con cinco regiones de G-1 a G-5, necesarios para la unión de la proteína a los nucleótidos guanina (GTP/GDP) y también para la hidrólisis de GTP. En esta zona se encuentran también 2 dominios de unión a los efectores GAPs (*GTPase-activating proteins*) y GEFs (*Guanylyl-exchanging factors*), llamados “Switch I” y “Switch II” (entre los residuos 32 y 38; y los residuos 59 y 67, respectivamente), necesarios para la aceleración de la actividad GTPasa y para catalizar la conversión de GDP en GTP, respectivamente. La región C-terminal de la proteína KRAS que empieza en el residuo 165, se denomina la región hipervariable por su alta variabilidad entre las proteínas RAS, salvo un motivo CAAX (C: Cisteína; A: amino ácido alifático; X: serina o metionina) que es altamente conservado y necesario para la unión de la proteína a la membrana citoplasmática y para las modificaciones post-transcripcionales de ésta (Crespo *et al.*, 2000; Bar-Sagi, 2001; Carta *et al.*, 2006) (Figura 16).



**Figura 16:** Distribución de los dominios funcionales de la proteína KRAS. La zona gris corresponde a la región hipervariable de la proteína y la zona negra corresponde al motivo CAAX. (Carta *et al.*, 2006).

Con el fin de cumplir la función de interruptor molecular en la transducción de señales recibidas por el receptor de tirosina quinasa (RTK) así como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la proteína KRAS tiene que estar unida a la cara interna de la membrana plasmática. Esta unión depende de las modificaciones post-transcripcionales de la proteína, siendo la más importante la farnesilación del residuo cisteína altamente conservado de la posición 186. En ausencia de estímulo la proteína KRAS se encuentra inactiva en el citoplasma y unida a GDP. La presencia de un estímulo, como la unión del factor EGF al receptor RTK, lleva a la autofosforilación de este último, lo cual produce sitios de unión de RTK al dominio SH2 de la proteína adaptadora GRB2 (*Growth-factor-Receptor-Bound protein 2*) y, a continuación, la unión a la proteína GEF. Esta unión cataliza el intercambio de GDP en GTP, activando de esta manera la proteína KRAS, lo que permite transmitir la señal a otras moléculas efectoras. A continuación,

GTP es hidrolizado a GDP, por la actividad GTPasa de KRAS y por el efector GAP, lo que permite que la proteína KRAS vuelva a su estado inactivo (Crespo *et al.*, 2000; Downward, 2003) (Figura 17).



**Figura 17.** Activación de la proteína KRAS. (Downward, 2003).

La respuesta de la célula a la activación de la proteína KRAS depende de varios factores, tales como el tipo celular, la isoforma expresada de KRAS y el nivel de expresión de ésta (Kranenburg, 2005). Una de las vías de señalización dependiente de la expresión de la proteína KRAS es la vía MAPK, implicada en la diferenciación y la proliferación celular.

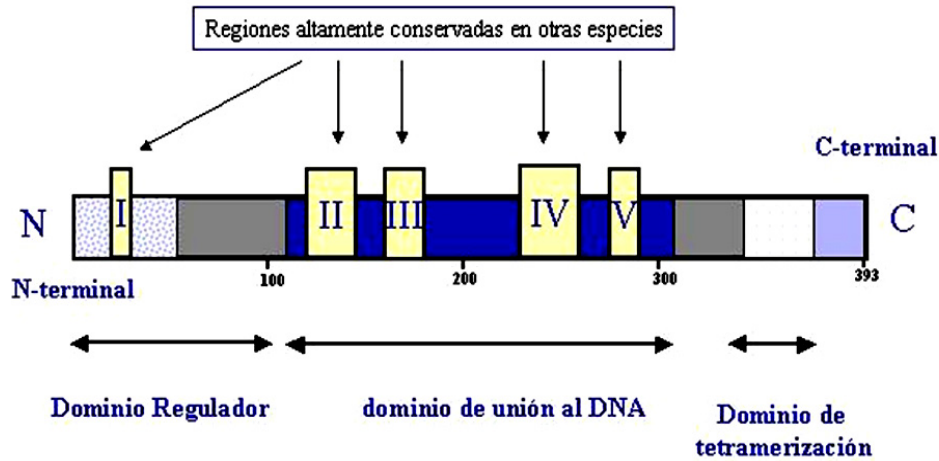
La transformación del proto-oncogen *KRAS2* en oncogen puede deberse a distintas causas, como la pérdida del factor GAP impidiendo la hidrólisis de GTP a GDP, la sobre-expresión del factor EGF, la alteración de uno de los efectores de *KRAS2* como el oncogen *BRAF*, o la alteración del propio gen *KRAS2*. Esta última está principalmente causada por mutaciones puntuales, ocurriendo frecuentemente en los codones 12, 13 y 61 (Crespo *et al.*, 2000; Downward, 2003), con una frecuencia de hasta el 90% en los codones 12 y 13, y de ~ 5% en el codon 61 (Brink *et al.*, 2003; Russo *et al.*, 2005a). Las mutaciones en estos codones generan defectos en la actividad GTPasa de la proteína KRAS haciendo que sea más resistente a la acción del efector GAP, lo que induce una activación constitutiva de la proteína y por lo tanto una estimulación continua de las vías de crecimiento y proliferación dependientes de *KRAS2* (Lowy *et al.*, 1993). Se han detectado las mutaciones del oncogen *KRAS2* en los tumores colorrectales con una frecuencia de entre el 30 y 50% aproximadamente y hasta el 90% en los tumores pancreáticos (Anderson *et al.*, 1992; Brink *et al.*, 2003; Downward, 2003; Russo *et al.*, 2005a). Por otra parte, se ha descrito que los tumores portadores de mutaciones en el codon 12 suelen presentar un fenotipo más agresivo con una mayor resistencia a la apoptosis en comparación con los tumores portadores del codon 13 mutado (Guerrero *et al.*, 2000).

#### 2.8.1.4. TP53

El gen *TP53* (*Tumor Protein p53*) fue el primer gen supresor de tumores identificado; y descrito como una fosfoproteína celular de 53 KDa con capacidad de unirse al antígeno T del virus SV40 (Lane *et al.*, 1979; Linzer *et al.*, 1979). *TP53* mapea en el cromosoma 17 (17p13.1), consta de 11 exones y genera un transcrito de 2.800 pb, codificando para una fosfoproteína nuclear compuesta de 393 aminoácidos y un peso de 53 KDa. La proteína p53 es ubicua, se expresa en pequeñas cantidades en las células normales, y desempeña varias funciones cruciales en el mantenimiento de la estabilidad genómica y el control del ciclo celular, como la detención de éste en respuesta al daño celular, la activación de los mecanismos de reparación del ADN, o la inducción de la apoptosis. Además, p53 está implicada en la replicación del ADN y en la respuesta celular a factores de estrés (Soussi *et al.*, 2001). Todas estas funciones han hecho que el gen *TP53* sea considerado como “el guardián del genoma” (Lane, 1992; Royds *et al.*, 2006).

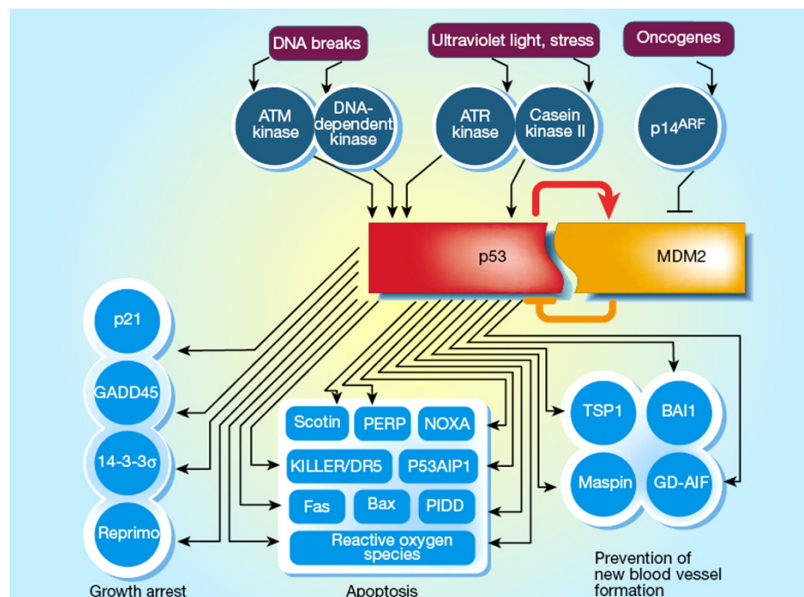
El exon 1 del gen *TP53* no es codificante, pero incluye 2 posibles sitios de inicio de transcripción, separados por unos 54 pb. El intrón 4 del gen contiene un promotor alternativo interno. Además la secuencia de *TP53* contiene varios sitios de *splicing* alternativo, lo que da lugar a 9 isoformas diferentes, que se expresan en el tejido normal, aunque todavía no se sabe qué isoforma está implicada en cada una de las funciones del gen (Bourdon *et al.*, 2005). La proteína p53 se encuentra principalmente en forma tetramérica y comprende varios dominios funcionales. Un dominio de transactivación en el extremo N-terminal, entre los residuos 1 y 50, está implicado en la activación transcripcional de la proteína y también en la unión a la proteína MDM2 (*Mouse double minute 2*), responsable de la regulación y de la estabilidad de p53. Este proceso se realiza por un mecanismo de *feedback* negativo permitiendo mantener una baja concentración de la proteína p53 y reducir la transcripción del gen *MDM2* (Soussi *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2002). En esta zona se encuentra también una región rica en prolinas (PXXP), permitiendo a p53 la inducción de la apoptosis como respuesta al daño celular. Otro dominio central “core”, está comprendido entre los residuos 100 y 300, que es la región más conservada de la proteína y cuya función es unirse a secuencias específicas del ADN, permitiendo a p53 actuar como un factor de transcripción. Otro de los dominios es el de tetramerización en el extremo C-terminal, responsable de la interacción entre los monómeros de la proteína, entre los residuos 325 y 355, y a final existe una zona no-específica de unión al ADN (figura 18). (Ahn *et al.*, 2001; Soussi *et al.*, 2001; Bourdon *et al.*, 2005). La proteína p53 está posteriormente sometida a modificaciones post-transcripcionales como la acetilación, la fosforilación, la glicosilación y la ubiquitinación, que permiten regular su unión específica a secuencias especiales del ADN y reconocer el daño celular (Vogelstein *et al.*, 2000).





**Figura 18.** Distribución de los dominios funcionales de la proteína p53.

El mayor factor de activación de la proteína p53 es el daño celular, como el ocasionado en el ADN por las irradiaciones ionizantes o la luz ultravioleta y por expresión de los oncogenes. Esta expresión de los oncogenes implica una estimulación de la proteína P14<sup>ARF</sup> (*CDKN2A alternate open reading frame*), que se une a MDM2 inhibiendo la actividad de ésta. Mientras que el daño ocasionado en el ADN se detecta por sensores como las kinasas o la proteína ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), llevando todos a un incremento del nivel de la proteína p53 y su estabilización en la célula. Este incremento suele ser proporcional al daño inducido y dependiendo de ello la proteína p53 se une a distintos genes con varias implicaciones, activando su transcripción, y haciendo al final que la respuesta de la célula varíe induciendo la parada del ciclo celular, la apoptosis o la prevención de la progresión tumoral por inhibición de la angiogénesis (Vogelstein *et al.*, 2000; Soussi *et al.*, 2001; Vousden *et al.*, 2007) (Figura 19).



**Figura 19.** Interacción de p53 con los diferentes factores activadores y de respuesta al daño celular. (Vogelstein *et al.*, 2000).

Al tener un papel tan importante en la regulación y el mantenimiento de las funciones básicas de la célula, cualquier pérdida de función en la proteína p53 supone a la célula un paso significativo en el proceso de malignización. Una de las alteraciones más comunes en el gen *TP53* son las mutaciones puntuales. Efectivamente, a pesar de su condición de supresor de tumores, el gen *TP53* suele sufrir principalmente mutaciones puntuales, que pueden actuar de forma dominante cuando afectan a los dominios de unión a secuencias específicas, produciendo una inactivación total de la proteína, además de su acumulación en la célula. Se ha descrito que tal acumulación podría ser responsable de un aumento de la agresividad tumoral además de un incremento del potencial metastásico, lo que explicaría el peor pronóstico observado en los pacientes portadores de mutaciones en el gen *TP53* (Soussi *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2005b; Vousden *et al.*, 2007). Se calcula que *TP53* se encuentra mutado en aproximadamente el 50% de las neoplasias humanas. En el cáncer colorrectal esta frecuencia varía entre el 40 y 50%, siendo el 80% de ellas en forma de cambio de sentido, produciendo la sustitución de un aminoácido por otro. Estas mutaciones ocurren principalmente en 5 puntos calientes, localizados entre los exones 5 y 8, en los codones 175, 245, 248, 273 y 282, que corresponden a la zona altamente conservada de la proteína (Russo *et al.*, 2005b). Las mutaciones germinales en este gen han sido relacionadas con el síndrome *Li-Fraumeni* de herencia dominante, caracterizado por una alta predisposición a desarrollar a edades tempranas una serie de neoplasias tales como sarcomas, leucemias, melanomas, cáncer de mama, de cerebro y de colon (Eeles, 1995; Soussi *et al.*, 2001).

#### 2.8.1.5. *DCC*

El gen *DCC* (*Deleted in colorectal carcinoma*) fue identificado por Fearon y colaboradores en los tumores colorrectales como un gen supresor de tumores, presentando deleciones en más del 70% de los casos (Fearon *et al.*, 1990b). *DCC* mapea en el cromosoma 18 (18q21.3) con 29 exones y un transcrito de 9.590 pb, que codifican para una proteína transmembrana compuesta de unos 1.447 residuos y un peso aproximado de 159 KDa. El gen *DCC* se expresa en la mayoría de los tejidos, incluyendo los epiteliales como la mucosa colónica. La proteína transmembrana *DCC* funciona como receptor de la netrina-1, que es un quimioatrayente que media en la diferenciación, la orientación y la migración de los axones durante el desarrollo neuronal. La proteína *DCC* demuestra igualmente unas características comunes con algunas moléculas de adhesión celular y participaría con otras proteínas en los mecanismos de interacción entre células, y entre las células y la matriz extracelular, por lo que las alteraciones en este gen favorecerían el crecimiento y la capacidad invasiva de los tumores (Arakawa, 2004; Ren *et al.*, 2004). La función supresora del gen *DCC* reside en su capacidad proapoptótica que depende de la presencia de un ligando: En presencia de la netrina-1 el gen *DCC* bloquea la apoptosis, mientras que en ausencia de ésta el gen *DCC* induce la apoptosis. *DCC* constituye igualmente un sustrato de la caspasa-3 y cualquier alteración en su sitio de unión

suprime el efecto proapoptótico del gen (Mehlen *et al.*, 1998; Mazelin *et al.*, 2004). La inactivación del gen *DCC*, mediante LOH, ha sido descrita en numerosas neoplasias tales como el cáncer gástrico, de páncreas, de esófago, el testicular y el colorrectal. Además, la LOH ha sido detectada en unas frecuencias más altas en las etapas tardías del desarrollo tumoral y asociada a la diseminación del tumor y a la aparición de metástasis, confiriendo un mal pronóstico a los pacientes (Miyake *et al.*, 1994; Jen *et al.*, 1994; Shibata *et al.*, 1996; Tarafa *et al.*, 2000).

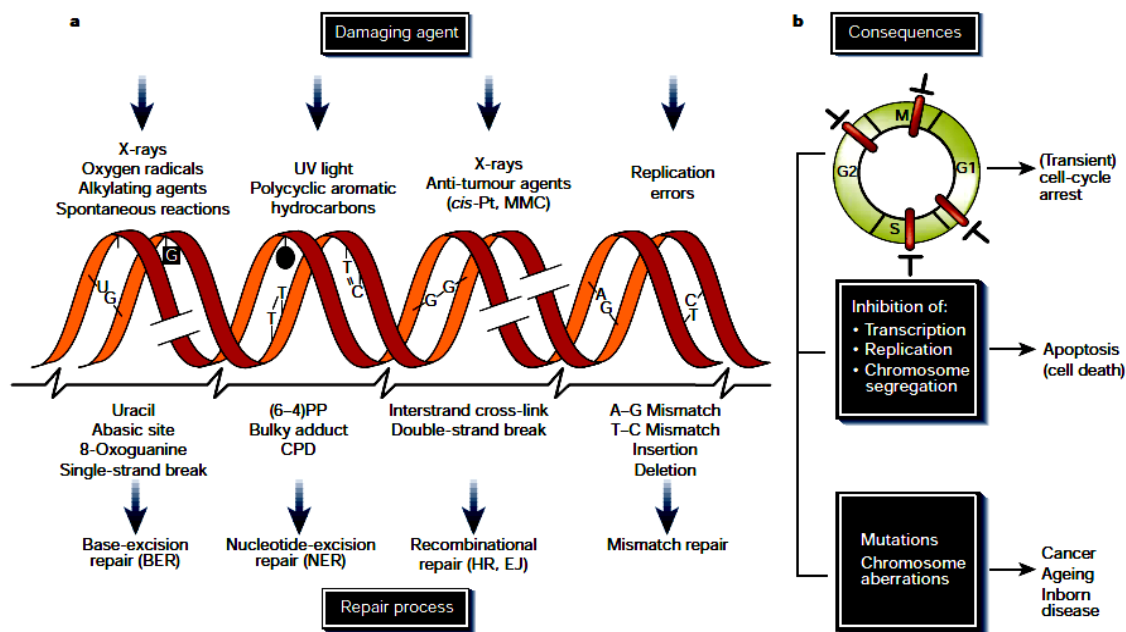
La proximidad de otro gen supresor de tumores (*SMAD4*) al locus de *DCC* en 18q21, además del número limitado de mutaciones detectadas en este gen y la falta de predisposición al cáncer observada en los ratones portadores de mutaciones en el gen *DCC*, hacen que el papel supresor de tumores de este gen sea un tema bastante controvertido entre los autores. Sin embargo, la introducción de una copia normal del cromosoma 18 en células de carcinoma colorrectal que carecen de la proteína DCC detiene el desarrollo tumoral, del mismo modo que la supresión de la expresión de *DCC* provoca la aparición de tumores, demostrando así que *DCC* ejerce, efectivamente, un papel supresor en la tumorigénesis (Mazelin *et al.*, 2004; Arakawa, 2004).

## **2.8.2.VÍA MUTADORA**

### **2.8.2.1. MUTADORES PRIMARIOS**

Las células están constantemente expuestas a múltiples agentes nocivos provocando lesiones en su ADN. Frente a estas lesiones se han desarrollado diferentes tipos de sistemas de corrección que se activan dependiendo del daño ocasionado. En general estos agentes carcinógenos se pueden agrupar en 3 categorías: Los agentes medioambientales, los productos originados por el metabolismo celular y los agentes químicos (Bertram, 2001; Hoeijmakers, 2001). Los 4 sistemas principales de reparación descritos en los mamíferos son: **BER** (*Base Excision Repair*), **NER** (*Nucleotide Excision Repair*), **DSB** (*Double-Strand Breaks*) y **MMR** (*Mismatch Repair*). Estos sistemas están altamente conservados a través de la evolución desde los procariotas hasta los eucariotas. Los cuatro sistemas se solapan parcialmente entre ellos y se activan en función del tipo del daño ocasionado en el ADN. La respuesta celular depende igualmente de este daño y puede inducir la parada del ciclo celular, la apoptosis o la carcinogénesis. La Figura 20 resume los posibles factores carcinógenos, los sistemas de corrección correspondientes y las posibles respuestas de la célula.





**Figura 20.** Posibles factores carcinógenos y sistemas de corrección correspondientes junto a las posibles respuestas de la célula. *Cis*-Pt: Cisplatina. MMC: Mitomicina C. (6-4) PP: fotoproductos. CPD: dímero de ciclobutano pirimidina. HR: sistema de recombinación homóloga. EJ: sistema de unión de extremos no homólogos. Ambos sistemas HR y EJ pertenecen al sistema DSB. (Hoeijmakers, 2001).

La alteración de estos sistemas se ha asociado con varias neoplasias. En el cáncer colorrectal el sistema más afectado es principalmente el MMR. El sistema de reparación de las bases mal apareadas (MMR) es responsable de la reparación de los errores post-replicativos, tanto los conducentes a la sustitución de una base por otra como a los originados por el deslizamiento de la polimerasa, dando pequeños bucles de inserción/delección (de 1 a 10 bases aproximadamente). El sistema MMR interviene igualmente durante los procesos de la meiosis, la transcripción y la recombinación homóloga (Jiricny, 1998b; Modrich, 1991; Modrich, 2006; Jiricny, 2006). Este sistema se compone de varios genes, descritos primero en *Escherichia coli* (*E.coli*) o en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y posteriormente se descubrieron sus homólogos en otros procariotas y en eucariotas superiores, como los humanos, reflejando la alta conservación del sistema en la escala evolutiva (Jiricny, 2006; Lin *et al.*, 2007). Los genes descubiertos en *E.coli* y sus homólogos en humanos son:

- ✓ **MutS**: codificado por una proteína ATPasa. Sus homólogos en humano son los genes: *MSH2* (cromosoma 2: 2p22-p21), *MSH3* (cromosoma 5: 5q11-q12), *MSH4* (cromosoma 1: 1p31), *MSH5* (cromosoma 6: 6p21.3) y *MSH6* (cromosoma 2: 2p16). (*MSH*: *MutS* homolog (*E.coli*)).
- ✓ **MutL**: codificado también por una proteína ATPasa de la familia GHKL (gyrase/Hsp90/histidine-kinase/*MutL*). Sus homólogos en humano son: *MLH1* (cromosoma 3: 3p21.3), *MLH3* (cromosoma 14: 14q24.3) (*MLH*: *MutL* homolog (*E.coli*)), *PMS1*

(cromosoma 2: 2q21-q33) y *PMS2* (cromosoma 7: 7p22.2) (*PMS: postmeiotic segregation increased (S.cerevisiae)*).

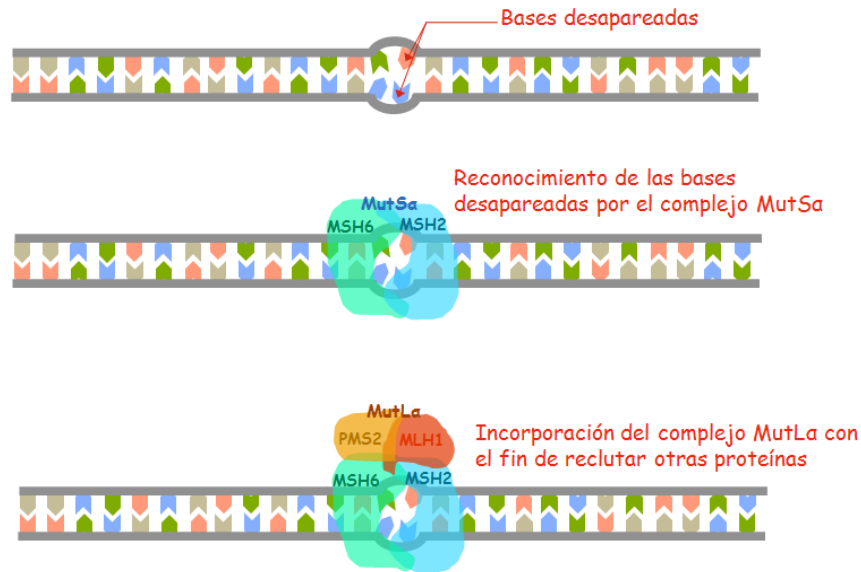
- ✓ **MutH**: endonucleasa detectada en bacterias Gram-negativo, no tiene homólogos en eucariotas.
- ✓ **MutU** o **UvrD**: helicasa cuyo homólogo tampoco se ha descrito en eucariotas.

Igual que en *E.coli* el reconocimiento de las bases mal apareadas en eucariotas se realiza mediante las proteínas de la familia MutS, salvo que en estos organismos superiores la proteína MutS ha sido reemplazada por 2 heterodímeros más específicos para la identificación de los errores: **MutSa** compuesto de las proteínas **MSH2-MSH6**, que reconoce las bases desapareadas y los pequeños bucles de inserción/delección (de 1 o 2 bases) y **MutSβ**, compuesto de las proteínas **MSH2-MSH3**, que reconoce preferentemente los IDL de 2 a 10 pb. En humanos, el complejo MutSa es más abundante que MutSβ (Marra *et al.*, 1998; Modrich, 2006). Por otra parte, la proteína MSH2 es imprescindible para el reconocimiento de los errores por el sistema MMR, puesto que interviene en ambos heterodímeros, por esta razón se ha observado que el gen *MSH2* está más implicado en neoplasias que los genes *MSH6* y *MSH3* (Edelmann *et al.*, 2000; Peltomäki *et al.*, 2004; Peltomäki, 2005). Las proteínas MSH son ATPasas con un dominio de unión a ATP de tipo *Walker*, que se encuentra altamente conservado en las proteínas del sistema MMR. La actividad ATPasa es necesaria para el funcionamiento de las proteínas MSH y por lo tanto para el funcionamiento del MMR. Se piensa que la hidrólisis del ATP sirve para el desplazamiento de estas proteínas a lo largo de la molécula de ADN (Blackwell *et al.*, 1998), aunque es bastante complicado demostrar este hecho (Jiricny, 2006). De las proteínas MSH4 y MSH5, por su parte, no existe mucha información sobre su funcionamiento (Paquis-Flucklinger *et al.*, 1997; Her *et al.*, 1998). Estas 2 proteínas forman un complejo (MSH4-MSH5), que parece no tener implicación en el sistema MMR, sino en el sistema DSB, uniéndose al complejo de *Holliday*, y participando en los mecanismos de recombinación homóloga y en la segregación de los cromosomas homólogos durante la meiosis (Paquis-Flucklinger *et al.*, 1997; Snowden *et al.*, 2004; Her *et al.*, 2007).

La segunda etapa en la corrección de los errores por el sistema MMR implica las proteínas de la familia MutL. Estas proteínas son también ATPasas, de la familia GHKL, con un dominio de unión a ATP en el extremo N-terminal y un dominio de dimerización en el extremo C-terminal (Jiricny, 2006). En *E.coli* MutL forma un complejo con MutS, activando la hidrólisis del ATP, lo que activa a su vez la endonucleasa MutH. En humanos la familia de proteínas MutL actúa también en heterodímeros: **MutLa** formado por las proteínas **MLH1-PMS2**, es el más abundante en humanos (Kunkel *et al.*, 2005; Modrich, 2006). Este heterodímero puede interaccionar con ambos heterodímeros MutSα y MutSβ y formar un complejo ternario con el fragmento de ADN a corregir con el fin de incorporar otras proteínas necesarias para la reparación del mismo (Genschel *et al.*, 2003). **MutLβ** está formado por las proteínas **MLH1-PMS1** y su implicación en el sistema MMR todavía no ha sido determinada (Räschle *et al.*, 1999;

Kunkel *et al.*, 2005), mientras el heterodímero **MutLy** formado por las proteínas **MLH1-MLH3**, está implicado en la recombinación meiótica y parece intervenir con el complejo MutLa en la corrección de las bases desapareadas y los pequeños bucles de inserción/delección (Cannavo *et al.*, 2005). La subunidad común en estos heterodímeros es la proteína MLH1, cuya función exacta todavía no ha sido del todo esclarecida. Se piensa que esta proteína actúa como mediador (*molecular matchmaker*) cuya función es reclutar otras proteínas necesarias para la corrección del daño identificado (Modrich, 1991; Jiricny, 2006). El papel importante que juega el gen *MLH1* en el sistema MMR explicaría el gran número de neoplasias causadas por su inactivación y la alta penetrancia de las mutaciones de este gen en los individuos portadores de las mismas, además de la aparición del fenotipo MSI en los tumores (Cunningham *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 1998; Simpkins *et al.*, 1999; Edelmann *et al.*, 2000; Peltomäki *et al.*, 2004; Peltomäki, 2005). El gen *PMS2* ha sido relacionado en menor medida con alteraciones y susceptibilidad al cáncer, y el gen *PMS1* ha sido aún menos implicado en carcinogénesis, mientras que la implicación del gen *MLH3* en la tumorigénesis colorrectal todavía no ha sido demostrada (Hamilton *et al.*, 1995; Peltomäki, 2005; Lynch *et al.*, 2006; Senter *et al.*, 2008). La Figura 21 resume las 2 primeras etapas de la corrección de los errores de ADN por el sistema MMR.

Con el fin de corregir las bases dañadas, el complejo MutS-MutL se tiene que unir al fragmento en cuestión en la hebra de ADN neo-sintetizada. Esta operación se realiza en *E.coli* por el reconocimiento de las adeninas todavía sin metilar en las secuencias (GATC), puesto que la nueva cadena tardará de 1 minuto a 2 en metilarse (Modrich, 1991; Jiricny, 2006). En humanos sin embargo este mecanismo sigue sin conocerse del todo. Se ha propuesto que el reconocimiento de la cadena neo-sintetizada se realizaría por medio de las muescas (*nicks*) producidas en los fragmentos de ADN, como los extremos 3' y 5' de los fragmentos de Okazaki originados durante la replicación del ADN, o la extremidad 3' del fragmento de replicación continua (Kunkel *et al.*, 2005; Modrich, 2006). Por otra parte, se ha propuesto que algunos factores de replicación podrían servir como marcadores, facilitando el reconocimiento de la nueva hebra de ADN, como la proteína nuclear PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) utilizada como cofactor por la polimerasa  $\delta$ . Se ha demostrado que esta proteína está implicada tanto antes como durante la replicación del ADN, y que su interacción con las proteínas del MMR es imprescindible para el reconocimiento y la escisión del fragmento de ADN dañado (Umar *et al.*, 1996; Flores-Rozas *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2006).

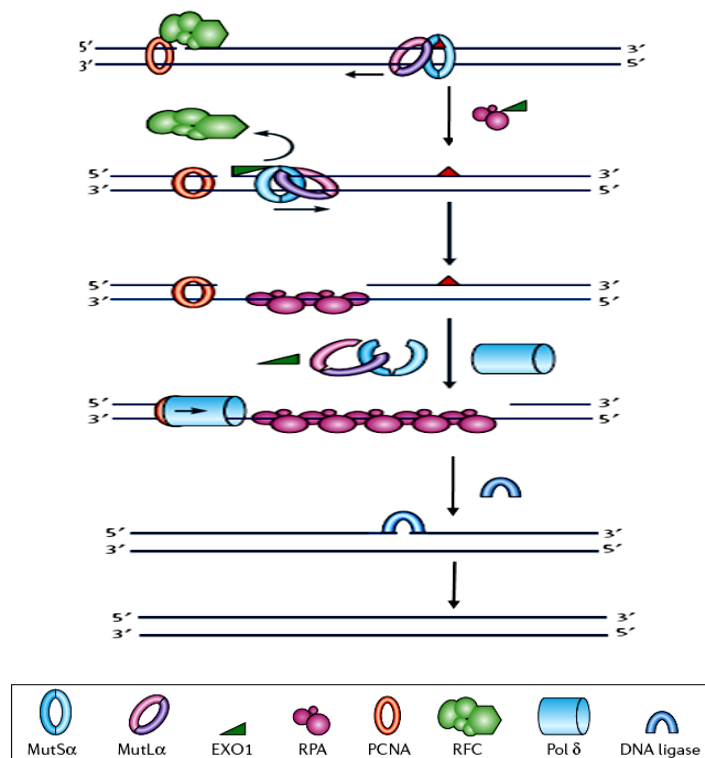


**Figura 21.** Resumen de las primeras etapas de la corrección del ADN por el sistema MMR: Reconocimiento de las bases erróneas por el complejo MutSα e incorporación del complejo MutLα.

El tercer paso de corrección en *E. coli* es la unión de la helicasa MutU (UvrD) al complejo formado por MutS-MutL además de la endonucleasa MutH, y otras exonucleasas (Exo), con el fin de cortar el fragmento dañado en la cadena neo-sintetizada. Este corte se realiza en la secuencia GATC más cercana a las bases erróneas. Una de las características importantes del sistema MMR es su bidireccionalidad, lo que significa que la secuencia GATC podría ser reconocida y cortada mediante exonucleasas en ambas direcciones 5' o 3' (Modrich *et al.*, 1996; Kunkel *et al.*, 2005). La incisión empezada se detiene sólo cuando las bases dañadas son completamente eliminadas. A continuación la ADN polimerasa III sintetiza el fragmento eliminado, utilizando la otra hebra de ADN como molde, y la ADN ligasa realiza el sellado. Al final la desoxiadenuina metilasa se encarga de metilar la secuencia GATC de la cadena nueva (Modrich *et al.*, 1996; Jiricny, 2006).

En humanos, este proceso también requiere la intervención de otros factores, muchos de los cuales participan también en el mecanismo de la replicación del ADN, como la proteína PCNA, necesaria para el funcionamiento de la polimerasa  $\delta$ , y cuyo funcionamiento requiere el factor de replicación RFC (*Replication Factor C*). La proteína RPA (*Single-Stranded binding-factor Replication Protein A*) interviene estimulando la incisión del fragmento de ADN a corregir y también en la síntesis del nuevo. La proteína HMGB1 (*Non-Histone Chromatin Component High-Mobility Group Box 1*) participa igualmente en el complejo de proteínas que cortan el ADN, además de la ADN exonucleasa 1 (Exo1). La ADN polimerasa  $\delta$  cataliza la síntesis de la nueva hebra de ADN y al final interviene la ADN ligasa I para sellarla (Kunkel *et al.*, 2005; Modrich, 2006; Jiricny, 2006) (Figura 22). No obstante, se ha descrito que los factores que intervienen en esta etapa no son los mismos si el corte se realiza en el sentido 3'→5' que si lo hace en el sentido 5'→3'. El complejo MutLα, por ejemplo, no parece ser imprescindible cuando la incisión del ADN se realiza en el sentido 5'→3'. En este caso sólo es necesario el complejo MutSα y las

proteínas Exo1 y RPA. Sin embargo, la presencia de MutL $\alpha$  parece optimizar el proceso de corrección (Jiricny, 2006), mientras que cuando el sentido del corte es de 3'→5' se requiere el complejo MutS $\alpha$  además del complejo MutL $\alpha$  y los factores PCNA, RPA, RFC y Exo1 (Kunkel *et al.*, 2005; Jiricny, 2006).



**Figura 22.** Modelo de corrección del ADN por el sistema MMR en el sentido 5'→3' modificado de (Jiricny, 2006).

*MLH1* y *MSH2* son los dos genes con mayor importancia en el sistema MMR, por lo que la alteración de cualquiera de ellos originaría la inactivación completa de este sistema. Las alteraciones germinales de *MLH1* y *MSH2* son responsables del 90% de los casos de HNPCC y la alteración epigenética de *MLH1* de más del 80% de los casos esporádicos de CCR (Lynch *et al.*, 2003; Herman *et al.*, 1998; Toyota *et al.*, 1999; Kuismanen *et al.*, 2000). No obstante, aun se desconoce la razón exacta por la cual la inactivación de este sistema está principalmente implicada en la tumorigénesis colorrectal.

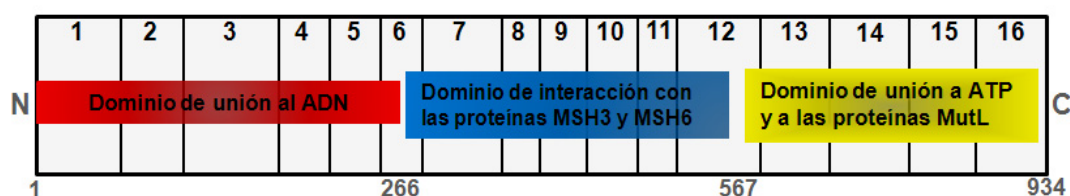
**MLH1:** El gen *MLH1* mapea en el cromosoma 3 (3p21.3) y se compone de 19 exones. En este gen se han descrito 4 transcritos diferentes que se diferencian en el número de exones que incluyen. La isoforma más completa incluye los 19 exones y produce un transcrito de 2.524 pb, codificando para una proteína de 756 residuos, y un peso aproximado de 85 KDa. El extremo N-terminal de la proteína MLH1 (entre los residuos 1 y 350) está altamente conservado entre todas las proteínas MutL. Este extremo incluye el dominio de unión a ATP así como el dominio de unión a las proteínas MutS. Entre los residuos 350 y 492 se encuentra un dominio central que

incluye una secuencia de localización nuclear de la proteína; mientras que el extremo C-terminal (entre los residuos 492 y 742) es el menos conservado y corresponde a la zona de dimerización con las proteínas PMS2, PMS1 y MLH3 (Ban *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 2001; Mohd *et al.*, 2006) (Figura 23).



**Figura 23.** Distribución de los dominios de la proteína MLH1.

**MSH2:** El gen *MSH2* mapea en el cromosoma 2 (2p22-p21), se compone de 16 exones y genera un transcrito de 3145 pb, codificando para una proteína de 934 residuos y un peso aproximado de 104,7 KDa. En este gen se han descrito igualmente 4 transcritos. El extremo N-terminal de MSH2 incluye un dominio responsable del reconocimiento del ADN erróneo y de unión a este (entre los residuos 1 y 266). El dominio central de la proteína está compuesto por dos regiones comprendidas entre los residuos 267 y 567, que corresponden al dominio de unión a las proteínas MSH3 y MSH6, mientras que el extremo C-terminal incluye un dominio de unión a ATP de tipo *Walker* (entre los residuos 568 y 765) y también de unión a las proteínas MutL. Este extremo está altamente conservado en las proteínas MutS (Lamers *et al.*, 2000; Obmolova *et al.*, 2000) (Figura 24).



**Figura 24.** Distribución de los dominios de la proteína MSH2.

Como se ha mencionado anteriormente, además de las mutaciones inactivantes, uno de los mecanismos de alteración más frecuente de estos genes, especialmente *MLH1*, en los tumores colorrectales esporádicos es la metilación de su promotor (Kane *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 1998; Toyota *et al.*, 1999; Kuismanen *et al.*, 2000).

**Polimorfismos en *MLH1*:** En el gen *MLH1* han sido descritos cerca de 300 polimorfismos, aunque la verdadera implicación de la mayoría de ellos, así como el riesgo relativo que pueden inducir en la carcinogénesis colorrectal, o en otras enfermedades, todavía se desconoce. Algunos de estos *SNPs*, sin embargo, han demostrado una clara implicación en el



cambio de expresión de este gen y han sido asociados con un efecto patológico. Algunos de estos *SNPs* son:

***MLH1* G415C (rs28930073):** El polimorfismo *MLH1* G415C, es un cambio de base única localizado en el nucleótido 415, en el exon 5 del gen, es responsable del cambio de un ácido aspártico por una histidina en el codon 132: GAT → CAT (D132H). Este codon se sitúa en el extremo N-terminal de *MLH1*, que corresponde al dominio ATPasa. Lipkin y colaboradores demostraron que este polimorfismo es responsable de la reducción de la actividad ATPasa de *MLH1*. Además este *SNP* se ha detectado en pacientes israelíes con CRC que no presentaban MSI, aunque con una frecuencia bastante baja (~ 1,3%), pero un riesgo elevado de CRC (OR = 4.6; 95% CI = 1.7-12.3) (Lipkin *et al.*, 2004). No obstante, estudios en población caucásica, americana y asiática no detectan ninguna relación entre *MLH1* G415C y el CRC (Shin *et al.*, 2005; Mei *et al.*, 2006; Schafmayer *et al.*, 2007).

***MLH1* A1852G/A1853C:** La variante 1852-1853 AA→GC consiste en un cambio dinucleotídico afectando las bases 1852 y 1853, en el exon 16 del gen *MLH1* (AAG → GCG). Este cambio es responsable de la sustitución de una lisina por una alanina en la posición 618 de *MLH1* (K618A). El codon 618 está situado en el extremo C-terminal de *MLH1* y corresponde al dominio de interacción con las proteínas PMS2, PMS1 y MLH3. La variante *MLH1* A1852G/A1853C fue descrita como una mutación de sustitución de base (Tannergard *et al.*, 1995). En un ensayo en vitro, Trojan y colaboradores demostraron que esta variante producía transcritos inestables que son a continuación eliminados por su incapacidad de heterodimerizar con la proteína PMS2 (Trojan *et al.*, 2002); reduciendo de esta manera la interacción de las proteínas *MLH1*-PMS2 en más del 85% de los casos (Guerrette *et al.*, 1999). *MLH1* A1852G/A1853C se ha asociado con un riesgo elevado de cáncer colorrectal (Liu *et al.*, 1999; Fearnhead *et al.*, 2004), y detectándose en pacientes sin o con baja inestabilidad de microsatélites (Guerrette *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Scartozzi *et al.*, 2002; Belvederesi *et al.*, 2006), considerándose una mutación de baja penetrancia en HNPCC (Blasi *et al.*, 2006). Por el contrario, otros estudios no encuentran ningún efecto patológico de esta variante y sugieren que *MLH1* K618A representa un simple polimorfismo (Raevaara *et al.*, 2005; Belvederesi *et al.*, 2006).

***MLH1* A655G (rs1799977):** El polimorfismo *MLH1* A655G es un cambio de base única originado por la sustitución de una adenina por una guanina en el nucleótido 655, en el exon 8 del gen *MLH1* (ATC → GTC), provocando el cambio de una isoleucina a una valina en el codon 219 (I219V). Esta variante se ha descrito como el polimorfismo exónico más frecuente en *MLH1*, así como la variante con la frecuencia de heterocigosis más alta de todos los polimorfismos exónicos

de este gen (Tournier *et al.*, 2004). Ambos residuos valina y isoleucina son neutros y hidrofóbicos, por lo que el cambio en el codon 219 de MLH1 no afectaría a la función de la proteína (Trojan *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha sugerido que la variante podría afectar a la fidelidad, así como a la velocidad de la síntesis proteica (Hudler *et al.*, 2004). La implicación de este *SNP* en la carcinogénesis colorrectal es igualmente controvertida. *MLH1* A655G se ha relacionado con la colitis ulcerosa (Bagnoli *et al.*, 2004), con un alto riesgo de leucemia linfoblástica aguda infantil (Mathonnet *et al.*, 2003) y con cáncer de mama (Listgarten *et al.*, 2004). En otros estudios sin embargo, no se ha encontrado ninguna asociación (Yu *et al.*, 2006; Berndt *et al.*, 2007; Raptis *et al.*, 2007).

#### **2.8.2.2. MUTADORES SECUNDARIOS**

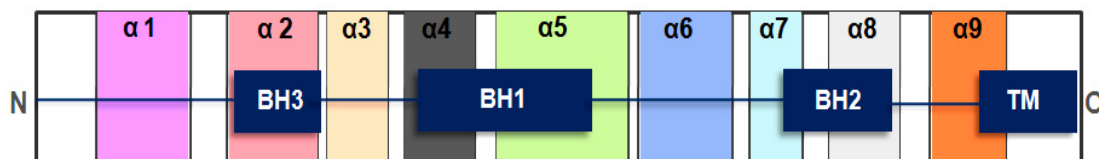
##### **2.8.2.2.1. BAX**

El gen proapoptótico *BAX* (*BCL2-associated X protein*), mapea en el cromosoma 19 (19q13.3-q13.4), se compone de 7 exones, y produce un transcrito de 905 pb codificando para una proteína de 164 residuos y un peso aproximado de unos 18 KDa. La secuencia de *BAX* contiene varios sitios de *splicing* alternativo, dando lugar a 5 isoformas distintas detectadas en diferentes tipos celulares.

Hasta el momento se han descrito más de 25 miembros en la familia de proteínas BCL2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*), que se pueden clasificar en dos grupos: las proteínas proapoptóticas como BAX, BAK (*BCL2-antagonist/killer 1*), BID (*BH3 interacting domain death agonist*), etc. y las proteínas antiapoptóticas como BCL2, BCL2L1 (*BCL2-like 1*), BCL2L2 (*BCL2-like 2*), etc. La interacción entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas regula el equilibrio entre la supervivencia y la muerte de la célula. Cuando se desestabiliza este equilibrio se ve afectada la capacidad celular de inducir la muerte celular programada (apoptosis), lo que lleva a la aparición de enfermedades como el cáncer, así como la respuesta a los tratamientos antitumorales con un efecto apoptótico. Este desequilibrio puede igualmente llevar a la aparición de enfermedades caracterizadas por una capacidad excesiva de inducción de la apoptosis, como las enfermedades neurodegenerativas (Fesik, 2000). Las proteínas de la familia BCL2 se caracterizan por la presencia de los dominios BH (*BCL2 homology*), incluyendo segmentos alfa-hélice. Sin embargo, el número de dominios varía dependiendo de la implicación de estas proteínas: Las proteínas antiapoptóticas incluyen 3 a 4 dominios conservados (BH1-BH4), mientras que las proteínas proapoptóticas generalmente presentan los dominios de BH1 a BH3, y no suelen presentar el dominio BH4. La proteína BAX contiene nueve hélices alfa: 7 anfipáticas dispuestas alrededor de 2 centrales hidrofóbicas. El dominio BH1 corresponde a las hélices  $\alpha 4$  y  $\alpha 5$ , el dominio BH2 a las hélices  $\alpha 7$  y  $\alpha 8$ ; y el dominio BH3 a  $\alpha 2$ . El extremo C-terminal corresponde al dominio transmembrana de la proteína y sirve para insertar ésta en la membrana mitocondrial externa, la del retículo endoplásmico y el núcleo; mientras que el dominio N-terminal y las hélices  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$



sirven para regular esta unión (Fesik, 2000; Petros *et al.*, 2004; Chipuk *et al.*, 2006; Gavathiotis *et al.*, 2008) (Figura 25).



**Figura 25.** Distribución de los dominios BH y las hélices  $\alpha$  de la proteína BAX. TM: dominio transmembrana. Modificado de (Chipuk *et al.*, 2006).

El dominio BH3 juega un papel muy importante en BAX, ya que es responsable de su activación y además corresponde al dominio de heterodimerización con las proteínas antiapoptóticas BCL2 y BCL2L1, con el fin de regular la apoptosis. La proteína BAX se encuentra en el citosol pendiente de su activación para actuar. Los factores responsables de la activación de BAX todavía se desconocen, pero se ha descrito que, por ejemplo, los cambios en el pH de la célula o algunos agentes químicos pueden actuar como estímulos induciendo la activación de BAX (Petros *et al.*, 2004). Por otra parte, existen proteínas responsables de la activación directa de BAX, una de ellas es la proteína p53, además de las proteínas BIM y BID, ambas pertenecientes a la familia BCL2 (Vogelstein *et al.*, 2000; Chipuk *et al.*, 2006). La activación de BAX provoca un cambio conformacional en la proteína permitiendo su heterodimerización y su transporte a la mitocondria y por consiguiente la inducción de la apoptosis (Petros *et al.*, 2004; Gavathiotis *et al.*, 2008). Aunque el mecanismo exacto de la inducción de la apoptosis tampoco está esclarecido, se ha propuesto que éste se realiza mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, y se piensa que esta última se lleva a cabo mediante la formación de poros en esta membrana a través de los cuales las proteínas existentes en el espacio intermembrana de la mitocondria, como el citocromo c, son liberadas al exterior (Annis *et al.*, 2005; Chipuk *et al.*, 2006).

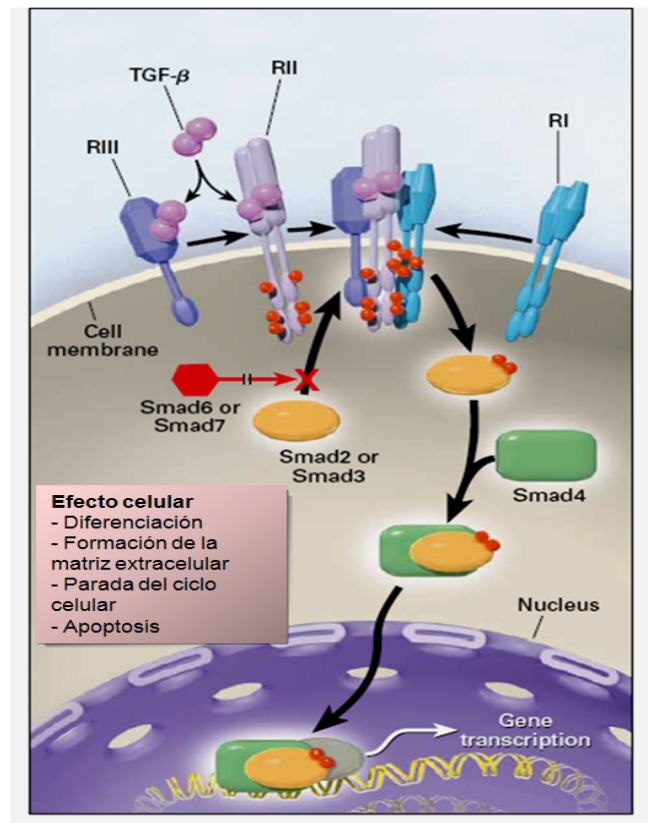
En el tercer exon del gen *BAX* se encuentra una repetición del mononucleótido (G), unas 8 veces: G<sub>8</sub>, incluida entre los codones 38 y 41, lo que hace que este gen sea susceptible a sufrir mutaciones durante su replicación, sobre todo si el sistema responsable de la corrección de este tipo de errores (MMR) es en sí defectuoso. Estas mutaciones son principalmente inserciones y deleciones en la secuencia repetida, llevando a la síntesis de una proteína no-funcional (Rampino *et al.*, 1997); lo que lleva a su vez a la alteración del sistema responsable de la eliminación de las células dañadas y por consiguiente a una ventaja selectiva en el crecimiento tumoral. Se ha demostrado que las células carentes de los genes supresores *BAX* y *BAK* son completamente resistentes a la apoptosis (Wei *et al.*, 2001). Dado el papel importante que juega *BAX* en el mecanismo de la carcinogénesis y su relación con los tumores MSI, varios autores propusieron a *BAX* como un gen diana en el desarrollo de la tumorigénesis colorrectal por la vía mutadora, así

como en la gástrica (Parsons *et al.*, 1995; Rampino *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1998; Duval *et al.*, 2002).

#### 2.8.2.2.2. *TGFBR2*

El gen del receptor de tipo 2 del factor de crecimiento celular TGFB: *TGFBR2* (*Transforming Growth Factor, beta receptor II*), mapea en el cromosoma 3 (3p22). Este gen supresor de tumores consiste en 7 exones, con un transcrito de 4.629 pb codificando para una proteína de 567 residuos y aproximadamente unos 64,6 KDa.

El factor de crecimiento TGFB es una citoquina implicada en el control de diferentes procesos biológicos, desde la diferenciación y la proliferación celular, o la formación de la matriz extracelular, hasta la parada del ciclo celular y la apoptosis. En humanos el factor TGFB tiene 3 isoformas: B1, B2 y B3, todas sintetizadas como proteínas homodiméricas. En la superficie de la célula existen dos receptores transmembrana para el factor TGFB: R1 y R2, ambos de tipo serina/treonina kinasa (Chen *et al.*, 1993). Sin embargo se ha descrito la existencia de un tercer receptor R3, más abundante incluso que R1 y R2, llamado Betaglicano (BG), y cuya función es captar la señal TGFB y transferirla a los receptores R1 y R2, lo que hace que estos dos últimos receptores tengan el papel más importante en la vía de señalización de TGFB (Blobe *et al.*, 2000). La respuesta celular a TGFB empieza por su unión a los receptores transmembrana: La señal TGFB se encuentra en un complejo latente (LLC: *Large Latent Complex*) y su liberación depende de muchos factores que actúan como activadores de TGFB, entre los que se han descrito las integrinas, las proteasas, los cambios del pH de la célula, las especies reactivas de oxígeno, o incluso los cambios en la matriz extracelular. De estos activadores dependerán también los niveles de TGFB liberados, así como la respuesta celular a éstos (Annes *et al.*, 2003). Después de transferir la señal a través de R3 o captarla directamente por R2, el factor TGFB se une al receptor R2, induciendo a su vez la unión de R2 con el receptor R1, formando un complejo en el cual el receptor R2 acaba fosforilando R1. Tal fosforilación es capaz de desencadenar una cascada de reacción en la célula, donde están implicadas las proteínas de la familia SMAD (nombre derivado de la proteína de *Drosophila* MAD: *Mother against decapentaplegic*, y de la proteína SMA de *Caenorhabditis elegans*); precisamente las R-SMADs (*Receptor-regulated SMADs*): SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 y SMAD8. Una vez en el núcleo, la señal interacciona con los factores de transcripción apropiados con el fin de inducir la actividad celular requerida (Blobe *et al.*, 2000; Annes *et al.*, 2003; ten Dijke *et al.*, 2004) (Figura 26).



**Figura 26.** Modelo del funcionamiento de la vía TGFβ, propuesto por Blobe (Blobe *et al.*, 2000). RI, RII y RIII: receptores R1, R2 y R3. Las I-SMADs (*Inhibitory SMADs*): SMAD6 y SMAD7 inhiben la señal recibida por los receptores por un efecto *feedback* inducido por el factor TGFβ.

La función supresora de TGFβ consiste en su papel de potente inhibidor del ciclo celular en varios tipos celulares, como las células epiteliales. Esta operación se realiza inhibiendo la producción o el funcionamiento de las ciclinas A y E, y las quinasas CDK2 y CDK4, implicadas en el control y la progresión del ciclo celular, y estimulando la producción de la proteína p15 inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas. Estos cambios inducen la hipofosforilación de la proteína Rb y por consiguiente la unión y la retención del factor E2F, responsable de inducir la transcripción de varios genes implicados en la progresión del ciclo celular, como el proto-oncogen *c-MYC*, lo que puede inducir la parada del ciclo celular en la fase G1 o la apoptosis (Blobe *et al.*, 2000).

Los defectos en la vía de señalización TGFβ se han relacionado con varias patologías, incluyendo la fibrosis, la osteoporosis, algunos síndromes cardiovasculares, algunas enfermedades psiquiátricas y el cáncer (Blobe *et al.*, 2000; Numata *et al.*, 2008). En el cáncer colorrectal, una de las alteraciones más frecuentes en esta vía es la alteración del gen del receptor R2 del factor de crecimiento TGFβ, responsable de la pérdida de respuesta a éste y, como consecuencia, de la interrupción de la ruta de señalización.

En la proteína TGFβR2 se han descrito tres dominios funcionales: El dominio extracelular, rico en cisteína, entre los residuos 1 y 172, un dominio hidrofóbico transmembrana

entre los residuos 172 y 208; y un dominio citoplásmico serina/treonina kinasa entre los residuos 300 y 547 (Tanaka *et al.*, 2000; Mátyás *et al.*, 2006) (Figura 27).

**Figura 27.** Distribución de los dominios funcionales de la proteína TGFBR2.

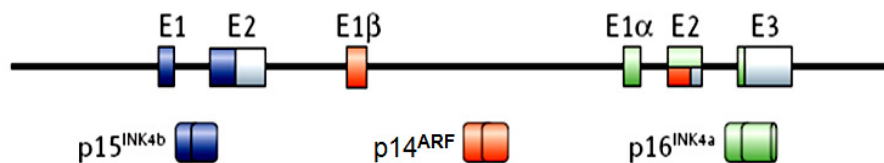
La vía TGFB tiene una importante implicación en el diagnóstico y pronóstico de los pacientes con cáncer, pues se ha descrito que la disminución de los niveles de expresión del factor TGFB se relaciona con la aparición temprana de la tumorigénesis; mientras que los niveles altos del factor TGFB1 se relacionan con la baja supervivencia de los pacientes portadores de tumores gástricos y con la aparición de tumores colorrectales invasivos (Blobe *et al.*, 2000). La importancia de esta ruta en el funcionamiento de las células normales y su implicación en la carcinogénesis humana, además de en otras enfermedades, hacen igualmente de ella una importante diana para las terapias antitumorales.

### 2.8.3. METILACIÓN EN EL CÁNCER COLORRECTAL

En el cáncer colorrectal, se han identificado una serie de genes, con distintas funciones, que se silencian por hipermetilación de su promotor; entre ellos están los genes reparadores *MLH1*, *MSH2* y *MGMT* y los genes supresores de tumores *APC*, *P14<sup>ARF</sup>* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; ARF*), *P15<sup>INK4b</sup>* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2B; INK4b*) y *P16<sup>INK4a</sup>* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; INK4a*) implicados en el control del ciclo celular; o el gen *CDH1* implicado en la adhesión celular y metástasis, etc. (Esteller *et al.*, 2001a; Xu *et al.*, 2004; Paluszczak *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2007).

La presencia simultánea, en los tumores, de la hipermetilación del promotor de varios genes específicos ha llevado a algunos autores a proponer la existencia de un “**fenotipo metilador**”: **CIMP** de sus siglas en inglés (*CpG island methylator phenotype*), análogo al fenotipo mutador (MMP), con el fin de describir un subgrupo de tumores que presentan una alta frecuencia de genes metilados y con unas características genéticas y clinicopatológicas comunes (Toyota *et al.*, 1999; Toyota *et al.*, 2000; van Rijnsoever *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008). Esta hipótesis ha generado mucha controversia y varios autores han intentado demostrar que tal fenotipo es inexistente, siendo la metilación del promotor un proceso más bien estocástico (Issa *et al.*, 2005; Hawkins *et al.*, 2002; Eads *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2003).

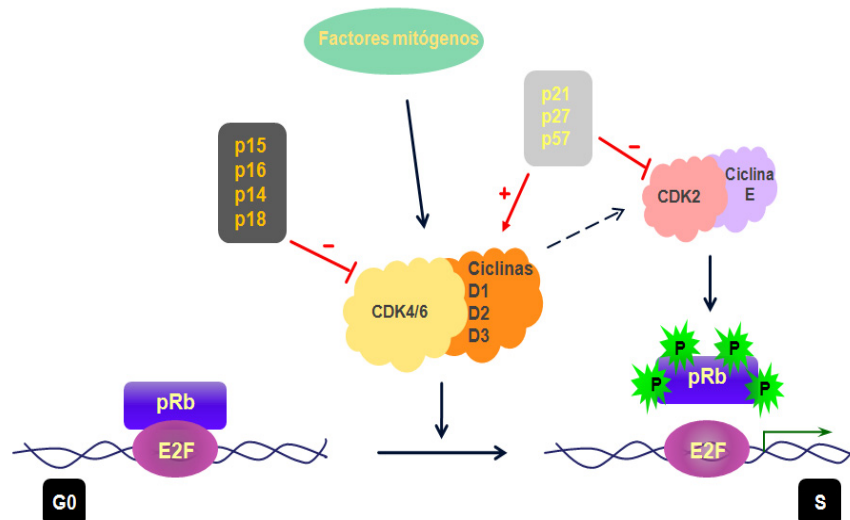
**Genes *P15* Y *P16*:** Los genes supresores de tumores *P15<sup>INK4b</sup>* y *P16<sup>INK4a</sup>* pertenecen a la familia de proteínas inhibidoras del ciclo celular (INK4). Ambos genes son adyacentes y mapean en el cromosoma 9 (9p21). Además este mismo locus codifica para una tercera proteína de la misma familia: *P14<sup>ARF</sup>*, que es un transcrito de la proteína p16, pero con un marco de lectura diferente (*Alternative Reading frame: ARF*). La proteína p14 está implicada en la estabilización de la proteína p53 a través de su interacción con la proteína MDM2 (Gil *et al.*, 2006). Por otra parte, existe otro gen de la misma familia INK4: *P18<sup>INK4C</sup>* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4): INK4c*), que mapea en el cromosoma 1 (1p32); es igualmente un gen supresor de tumores, regulando el ciclo celular en la fase G1. El locus donde mapean los 3 genes *P15*, *P14* y *P16*, se compone de 6 exones, y presenta una organización bastante inusual y complicada por la presencia de un exon adicional (E1β) entre *P15* y *P16*, que pertenece a la secuencia de *P14* y *P16*. Estos dos genes están transcritos a partir de dos promotores distintos. *P14* incluye el exon E1β y una parte del exon E2, que comparte con *P16*, pero sin coincidir en la secuencia, ya que los dos genes presentan un marco de lectura diferente, mientras que *P16* incluye los exones E1α, E2 y E3 (Figura 28). En cuanto a *P15*, éste se compone de los exones E1 y E2, completamente independientes de los demás exones, localizados al principio del locus (en azul en la Figura 28) (Ortega *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006b).



**Figura 28.** Organización del locus de *P15*, *P14* y *P16*. (Gil *et al.*, 2006).

El transcrito de *P15* es de unos 3.829 pb codificando para una proteína de unos 138 residuos y un peso aproximado de 14,7 KDa, mientras que el transcrito de *P16* es de unos 1.160 pb, codificando para una proteína de 156 residuos y un peso aproximado de 16,5 KDa.

En la fase G0 del ciclo celular, la proteína pRb, de la familia de las proteínas reguladoras del ciclo celular Rb, se encuentra activa (no-fosforilada), lo que permite su unión a otras proteínas, como el factor de transcripción E2F, impidiendo de esta manera la transcripción de otros genes. Al entrar en el proceso de la división celular, los factores mitógenos activan las ciclinas D1, D2 y D3 y sus kinasas respectivas CDK4 y CDK6, lo que implica una fosforilación parcial de la proteína pRb, que produce su desactivación parcial, permitiendo de esta manera que el factor E2F pueda inducir la transcripción de los genes necesarios para entrar en la fase S del ciclo celular, como la ciclina E1. Esta última activará, a su vez, la kinasa CDK2, lo que inducirá una fosforilación completa de la proteína pRb, que se desactiva, libera el factor E2F y se produce la transición de la célula de la fase G1 a la fase S (Ruas *et al.*, 1998; Ortega *et al.*, 2002; Cánepa *et al.*, 2007) (Figura 29).



**Figura 29.** Regulación de la transición celular de G0 a S e implicación de las proteínas p15 y p16. Modificado de (Ruas *et al.*, 1998).

La estructura de las cuatro proteínas de la familia INK4 comparte la presencia de dominios ankirina, facilitando su interacción con otras proteínas. Mediante estos dominios, las



proteínas P15 y P16, igual que P14 y P18, se unen específicamente a las kinasas CDK4 y CDK6, impidiendo la unión de éstas a las ciclinas D1, D2 y D3, y por lo tanto la activación del complejo ciclina-kinasa, lo que induce la parada del ciclo celular en la fase G1 (Ortega *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2006). Existe una segunda familia de proteínas inhibidoras de las kinasas: las CIP/KIP, incluyendo las proteínas P21, P27 y P57, caracterizadas por su capacidad de unión a las kinasas CDK4 y CDK6 así como a las kinasas CDK2. Sin embargo, este grupo de proteínas puede actuar de dos maneras distintas: positivamente, activando la unión de las kinasas CDK4/6 con las ciclinas D en la fase G1 temprana y por lo tanto promoviendo la progresión del ciclo celular; o negativamente sobre el complejo CDK2-ciclina E y por lo tanto inhibiendo el ciclo celular. Existe, por tanto, una competitividad entre las distintas proteínas por la unión con las kinasas CDK4 y CDK6, o CDK2 (Trimarchi *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha descrito que algunos factores pueden inducir una respuesta celular o la otra; por ejemplo, una sobre-expresión de las proteínas INK4 provoca directamente la parada del ciclo celular (Gil *et al.*, 2006), y se ha descrito que esta repuesta se puede obtener igualmente como resultado de la sobre-expresión de algunos oncogenes como *KARS2*, *BRAF* y *c-MYC*; o mediante el gen supresor de tumores *TGFBR2*, induciendo una sobre-expresión de P15, o mediante daños celulares inducidos por la luz ultravioleta, las radiaciones ionizantes o algunos agentes químicos. Por otra parte, existen también factores supresores de las proteínas INK4, como el gen *TP53*, cuya activación induce una sobre-expresión de la proteína p21, lo que inhibe a su vez la activación del complejo CDK2-ciclina E y, por consiguiente, la fosforilación de la proteína pRb, provocando al final la parada del ciclo celular en la fase G1 (Ruas *et al.*, 1998; Gil *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006b). Sin embargo, la sobre-expresión de las proteínas INK4, especialmente P16, no se observa sólo durante la transformación neoplásica, sino que se detecta igualmente en tejidos sanos durante el proceso de la senescencia (Cánepa *et al.*, 2007).

Los genes *P15*, *P14* y *P16* constituyen una defensa anti-tumoral para el organismo por su importante papel de supresores de tumores, por lo que la pérdida de los tres está implicada en numerosas neoplasias. Efectivamente, el locus de estos genes se encuentra frecuentemente delecionado en varios tipos tumorales como las leucemias, los melanomas, los glioblastomas, el cáncer pancreático, el de esófago, de vejiga y de pulmón (Ruas *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2006b). Además, la pérdida de ambos genes, *P15* y *P16*, ha sido asociada a una peor supervivencia de los pacientes portadores de sarcomas de tejido blando (Orlow *et al.*, 1999). Aparte de las deleciones, las mutaciones puntuales han sido igualmente descritas como responsables de la alteración del gen *P16*, al contrario del gen *P15*, donde pocas alteraciones de este tipo han sido observadas (Ruas *et al.*, 1998; Goldstein, 2004; Kim *et al.*, 2006b). La metilación del promotor de estos genes también ha sido observada en algunas neoplasias como en las leucemias, los linfomas, los gliomas, en el cáncer de esófago, de páncreas, de cabeza y nuca, y de colon, aunque se ha

detectado más frecuentemente en el gen *P16* que en el gen *P15* (Herman *et al.*, 1996**b**; Uchida *et al.*, 1997; Wiencke *et al.*, 1999; Esteller *et al.*, 2001**a**; Puri *et al.*, 2005).



## *OBJETIVOS*



## OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es la caracterización de las alteraciones genéticas implicadas en la tumorigénesis colorrectal esporádica desarrollada por la vía mutadora. Esto se ha llevado a cabo a través de la consecución de los siguientes objetivos parciales:

1. Análisis de la inestabilidad de los microsatélites en los tumores de los pacientes de esta serie con el fin de poder clasificarlos según el sistema de inestabilidad establecido.
2. Determinación de la relación de los grupos MSI con las distintas variables genéticas y clinicopatológicas, así como la supervivencia de los pacientes.
3. Análisis de la implicación de *TGFBR2* y *BAX*, como genes diana, en el mecanismo de la tumorigénesis colorrectal desarrollada por la vía mutadora, en la aparición de la inestabilidad genómica característica de esta vía y su posible valor diagnóstico y pronóstico de los pacientes.
4. Determinación de la posible existencia del fenotipo metilador “CIMP” mediante el establecimiento del patrón de metilación de los genes *MLH1*, *MSH2*, *P15*, *P16* y *CDH1*, clarificando la relación entre la metilación de estos genes y las diferentes características genéticas, incluido el nivel MSI, y clinicopatológicas de los tumores analizados.
5. Análisis de polimorfismos del gen *MLH1*: *MLH1* D132H (rs28930073), *MLH1* I219V (rs1799977) y *MLH1* K618A (1852-1853 AA>GC), con el fin de determinar su posible contribución al riesgo de desarrollar CCR, a la progresión tumoral en la carcinogénesis colorrectal esporádica desarrollada por la vía mutadora, así como a la supervivencia de los pacientes.



## *PACIENTES Y MÉTODOS*



# PACIENTES Y MÉTODOS

## 1. PACIENTES Y CONTROLES

El estudio comprende una serie de 176 pacientes con carcinomas colorrectales esporádicos (CCR) sometidos a cirugía programada o urgente, en el Hospital Universitario de Getafe (Madrid, España), entre Febrero de 1992 y marzo de 1996. Todos los pacientes incluidos en el estudio dieron su consentimiento informado. Además, el Comité de Ética del hospital aprobó favorablemente el protocolo empleado durante el desarrollo del estudio.

Ninguno de los pacientes presentaba un historial familiar de FAP o HNPCC. Los criterios de exclusión del estudio fueron: haber recibido tratamientos de radio o quimioterapia anteriormente a la intervención quirúrgica, presentar un historial de enfermedades inflamatorias del intestino, presentar múltiples pólipos adenomatosos en el colon, o haber presentado previamente otro tipo de tumoración en cualquier otra localización o muerte post-operativa. El seguimiento de los pacientes se realizó en el servicio de cirugía del mismo hospital y la determinación de su estado se actualizó cada 6 meses. El seguimiento finalizó en Julio de 2001, con un tiempo medio de seguimiento de  $44,3 \pm 22,8$  meses. Veinte pacientes se descartaron del estudio por falta de información, muerte post-operativa o por razones técnicas; por ello, final se incluyeron en el estudio 156 pacientes con CCR esporádico: 88 varones (56,41%) y 68 mujeres (43,58%), con una media de edad de  $67,22 \pm 12,7$  años.

Los tumores extirpados fueron analizados por el Servicio de Patología del hospital con el fin de determinar su nivel de diferenciación, el estadio de Dukes y la invasión linfática y vascular de los mismos. La Tabla 4 resume las características clinicopatológicas de los tumores analizados. De todos los pacientes se obtuvieron muestras de sangre periférica y de tejido tumoral y normal (tejido colónico adyacente al tumor sin que esté afectado por éste). Las muestras de tejido fueron inmediatamente almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , dentro de las 2 horas siguientes a la extirpación quirúrgica.

Variable	N° de casos	Porcentaje (%)
<b>Sexo</b>		
Varón	88	56,4
Mujer	68	43,6
<b>Edad (16-93)</b>		
<50	17	10,9
>50	139	89,1
<b>Localización</b>		
Derecha	34	21,8
Izquierda	122	78,2
<b>Diferenciación</b>		
Bien	70	44,9
Moderada	72	46,2
Pobre	13	8,3
<b>Estadio de Dukes</b>		
A	11	7,1
B	58	37,2
C	58	37,2
D	29	18,6
<b>Recurrencia</b>		
No	108	69,2
Si	23	14,7
<b>Metástasis</b>		
No	96	61,5
Si	36	23,1
<b>Invasión vascular</b>		
No	123	78,8
Si	20	12,8
<b>Invasión linfática</b>		
No	79	50,6
Si	63	40,4
<b>Fenotipo mucosecretor</b>		
No	129	82,7
Si	12	7,7

**Tabla 4.** Características clinicopatológicas de los pacientes.

## CONTROLES

Se ha incluido en el análisis un grupo control constituido por 124 donantes sanos anónimos, entre marzo y octubre de 2005. Todos ellos dieron su consentimiento informado previo al inicio del estudio. Pacientes y controles fueron pareados en frecuencia por sexo y edad. De este grupo control se obtuvieron muestras de sangre periférica.

## 2. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de las muestras obtenidas (sangre, tejido normal y tejido tumoral) de los pacientes y los controles.

### EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

La extracción del ADN se realizó a partir de 10 ml de sangre heparinizada mediante el método estándar, incluyendo los siguientes pasos:



- **Extracción del suero sanguíneo:** Mediante una centrifugación de 15 minutos a 4°C y a 3000 g. A continuación se añadió suero fisiológico y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Al final se retiró el sobrenadante.
- **Eliminación de los hematíes y recogida de los leucocitos:** Mediante choque hipotónico con agua bidestilada y agitación manual durante 15 minutos, seguida por una centrifugación de 15 minutos a 4°C y a 3000 g. Este proceso se repitió 2 veces para asegurarse de la eliminación de todos los hematíes.
- **Extracción de las proteínas:** Se añadió al pellet el tampón de extracción de ADN-I (Tris 20 mM a pH 8.0; MgCl<sub>2</sub> 5 mM) y se mantuvo en hielo durante 10 minutos. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 4°C, a 3000 g. En un segundo paso se incubó con el tampón de extracción de ADN-II (Tris-ClH 10 mM a pH 8.0; EDTA 100 mM a pH 8.0; RNasa libre de DNasa 20 µg/ml; SDS 0,5 %) durante una hora a 37°C en el *roller*. Al final se añadió Proteinasa K (100 µg/ml) y se incubó el tubo durante toda la noche a 37°C en el *roller*.
- **Extracción fenólica:** Consistió en lavados sucesivos con fenol, fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y cloroformo-isoamílico (24:1). Cada uno seguido de una centrifugación de 15 minutos a temperatura ambiente y a 4000 g.
- **Precipitación del ADN:** Se añadió al pellet 0.2 volúmenes de acetato amónico 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se volvió a lavar el ADN obtenido con etanol al 70% y al final se resuspendió en una solución de Tris-EDTA a pH 8.0.
- **Medida de la concentración del ADN extraído:** Se estimó mediante espectrofotometría (Pharmacia Biotech; GeneQuant II). A continuación las muestras obtenidas se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

## EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS MUESTRAS DE TEJIDO

La extracción de ADN de los tejidos normal y tumoral se realizó utilizando el FastDNA™ Kit MS, de BIO 101 systems (Q-Biogene; Irvine California), con el protocolo estándar para la extracción de ADN a partir de tejidos animales semiblandos:

- **Homogenización de la muestra:** Se añadieron 200 mg de tejido a un tubo con esferas cerámicas.
- **Extracción del ADN:** Se añadió el tampón de extracción de ADN-II (Tris-ClH 10 mM a pH 8.0; EDTA 100 mM a pH 8.0; RNasa libre de DNasa 20 µg/ml; SDS 0,5 %), y se agitó la mezcla en un homogeneizador de células Fast-Prep (FP120 de BIO 101 savant) a velocidad 6.0 durante 20 segundos hasta la maceración completa del tejido. A continuación se incubó el tubo en hielo durante 1 a 2 minutos. Se dejó en reposo durante 2 minutos y se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo que se incubó durante una hora a 37°C en el *roller*. Después se añadió Proteinasa K (100 µg/ml) y se incubó durante toda la noche a 56°C.
- **Extracción fenólica:** Mediante lavados sucesivos de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y cloroformo-isoamílico (24:1), seguidos de una centrifugación de 2 minutos a 12000 g.
- **Precipitación del ADN:** Se añadió 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20°C), después se centrifugó durante 2 minutos a 12000 g, se resuspendió en una solución de Tris-EDTA a pH 8.0 y se incubó durante 30 minutos a 56°C en el *roller*. A continuación se añadió acetato amónico 2.0 M y etanol frío (-20°C) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se volvió a lavar el ADN obtenido con etanol al 70% y al final se resuspendió en una solución de Tris-EDTA a pH 8.0.
- **Medida de la concentración del ADN extraído:** Se estimó mediante espectrofotometría (Pharmacia Biotech; GeneQuant II) y a continuación las muestras obtenidas se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

### 3. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

En un primer paso, se analizó el panel de los 5 microsatélites estandarizados (Boland *et al.*, 1998): BAT25; BAT26; D2S123; D5S346 y D17S250 (Tabla 5). En algunos casos, para confirmar el nivel de inestabilidad de microsatélites, se analizó un panel adicional de hasta 11 marcadores dinucleotídicos: D2S391; D2S378; D2S136; D3S1029; D3S1611; D3S1298; D3S1561; D5S107; D17S1176; D17S578; D18S74E (Tabla 5).

### 4. ANÁLISIS DE LA PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD

Para la detección de la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el gen *APC* se utilizaron los microsatélites APC y D5S107, mientras que para la detección de LOH en el gen *DCC* se utilizó D18S74E y para el gen *TP53* los microsatélites D17S1176 y D17S578 (son intrónico y adyacente al gen respectivamente) (González-Aguilera *et al.*, 1999). La localización de estos microsatélites y las secuencias de los cebadores utilizados se resumen en la Tabla 5.

Microsatélite	Localización	Secuencia de los cebadores
<b>BAT25</b>	<i>C-Kit</i> (Intron 16; 4q 11-12)	<b>F:</b> TCGCCTCCAAGAATGTAAGT <b>R:</b> TCTGCATTTTAACTATGGCTC
<b>BAT26</b>	<i>MSH2</i> (Intron 5; 2p 16)	<b>F:</b> TGACTACTTTTGACTTCAGCC <b>R:</b> AACCATTCAACATTTTAAACCC
<b>D2S123</b>	<i>MSH2</i> (Centromérico; próximo al locus de <i>MSH2</i> ; 2p16-2p16)	<b>F:</b> AAACAGGATGCCTGCCTTTA <b>R:</b> GGACTTTCCACCTATGGGAC
<b>D5S346</b>	<i>APC</i> (próximo a la extremidad 3' de <i>APC</i> ; 5q21-q22)	<b>F:</b> ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG <b>R:</b> AGCAGATAAGACAGTATTACTAGT
<b>D17S250</b>	<i>NF1</i> (17q11.2-q12)	<b>F:</b> GGAAGAATCAAATAGACAAT <b>R:</b> GCTGGCCATATATATTTAAACC
<b>D2S391</b>	<i>MSH2</i> (telomérico; 2p15-p21)	<b>F:</b> ATGGAGCCAGTAGGTTACAGC <b>R:</b> GGTGAGAGGGTATGATGG
<b>D2S378</b>	<i>MSH2</i> (Centromérico; 2p16)	<b>F:</b> TGTGGGCTGGTCAGATATTC <b>R:</b> CGCTAGGATCACTATGTTTTGC
<b>D2S136</b>	<i>MSH2</i> (Centromérico; próximo a D2S123; 2p16)	<b>F:</b> AGCTTGAGACCTCTGTGTCC <b>R:</b> ATCAGAAGAAACAGTGATGGT
<b>D3S1029</b>	<i>MLH1</i> (telomérico; 3p21.3-p21.2)	<b>F:</b> ATACTCTGGACCCAGATTGATTAC <b>R:</b> TAATTCCCAAATGGTTTAGGGGAG
<b>D3S1611</b>	<i>MLH1</i> (intrónico; 3p21.3)	<b>F:</b> CCCC AAGGCTGCACTT <b>R:</b> AGCTGAGACTACAGGCATTTG
<b>D3S1298</b>	<i>MLH1</i> (próximo a D31611; 3p21.3)	<b>F:</b> AGCTCTCAGTGCCACCCC <b>R:</b> GAAAAATCCCCTGTGAAGCG
<b>D3S1561</b>	<i>MLH1</i> (próximo al locus <i>MLH1</i> ; 3p21)	<b>F:</b> TAAGTCCCAGAGGCAAAG <b>R:</b> CGCTAAACTATCCACAGGACAC
<b>D5S107</b>	<i>APC</i> (próximo al locus de <i>APC</i> ; 5q14.3)	<b>F:</b> GGCATCAACTTGAACAGCAT <b>R:</b> GATCCACTTTAACCCAAATA
<b>D17S1176</b>	<i>TP53</i> (intrónico; 17p13.1)	<b>F:</b> ACTGCCATCCCTTGCCCAATTC <b>R:</b> AGGGATACTATT CAGCCCGAGGTG
<b>D17S578</b>	<i>TP53</i> (telomérico; próximo al locus de <i>TP53</i> ; 17pter-p31.1)	<b>F:</b> CTGGAGTTGAGACTAGCCT <b>R:</b> CTATCAATAAGCATTGGCCT
<b>D18S74E</b>	<i>DCC</i> (centromérico; próximo al locus de <i>DCC</i> ; 18q12.2-18q12.3)	<b>F:</b> AGTAATGGTCCAGGCCCTGG <b>R:</b> GACCGGAATATCTGATTATC
<b>APC</b>	<i>APC</i> (próximo al locus de <i>APC</i> ; 5q(21-22)	<b>F:</b> CTATGTAGTGGCCGTTCTTTTG <b>R:</b> CAGCCCCACAGGTCTTTTGT

**Tabla 5.** Localización de los microsatélites y las secuencias de los cebadores utilizados para su análisis.

## AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES

La mezcla de reacción se llevó a cabo, en todos los casos, en un volumen total de 10  $\mu$ l, añadiendo 100 ng de ADN genómico, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5 -1  $\mu$ M de cada cebador, 1 unidad de *Tth* polimerasa y tampón específico de *Tth* con 1,5 mM de  $MgCl_2$ . La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer Cetus 480.0. Como control de las PCR se utilizó una mezcla de reacción con los cebadores correspondientes, pero sin ADN problema.

Las condiciones de amplificación de cada uno de los microsatélites analizados se resumen en la Tabla 6.

Microsatélite	Ciclos de la PCR						Amplicon (pb)
	Desnat. previa	Desnat.	Reasoc.	Extens.	Extens. Adic.	Nº ciclos	
BAT25	94°C – 8min	94°C – 30s	50°C – 30s	72°C – 30s	72°C – 6min	40	120
BAT26							116
D2S123	94°C – 8min	94°C – 30s	55°C – 2min	72°C – 15s	72°C – 6min	27	197 – 227
D2S391							150
D2S136							91 – 111
D2S378							203
D5S346							96 – 122
D17S250							151 – 169
D3S1029	94°C – 8min	94°C – 30s	55°C – 2min	72°C – 15s	72°C – 6min	35	168
D3S1298							194 – 220
D3S1611							252 – 268
D3S1561							225
D5S107	94°C – 3min	94°C – 50s	58°C – 40s		72°C – 6min	30	133 – 155
D17S1176	94°C – 10min	94°C – 30s	65°C – 20s	72°C – 15s	72°C – 6min	27	103 – 135
D17S578	94°C – 10min	94°C – 30s	55°C – 2min30s	72°C – 25s	72°C – 6min	27	148 – 174
D18S74E	94°C – 10min	94°C – 30s	55°C – 1min30s	72°C – 15s	72°C – 6min	27	122 – 140
APC	94° C- 10 min	95°C – 1min	50°C – 2min	72°C – 1min	72°C – 6min	35	100 – 134

**Tabla 6.** Condiciones de amplificación de los microsatélites analizados.

## ELECTROFORESIS Y VISUALIZACIÓN DEL RESULTADO DE LAS AMPLIFICACIONES

Los productos de amplificación de PCR se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, continuos y verticales al 6 – 12%. El tampón de recorrido utilizado fue el TBE (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM y EDTA 2 mM; pH 8.2).

En los geles se cargó una cantidad de 1 a 5  $\mu$ l del producto de amplificación, dependiendo de cada microsatélite, con el tampón de carga 6XBC (Bromofenol blue 0,25%, xilencianol 0,25% y glicerol 30%). En todos los casos las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Las condiciones de electroforesis de los distintos microsatélites figuran en la Tabla 7.

Microsatélite	Acrilamida	Voltaje (V)	Tiempo de recorrido
BAT25 BAT26	12%	200	Toda la noche
D2S123 D5S346 D17S250	15%	700	Toda la noche
D2S391 D2S136 D3S1029 D3S1298 D3S1611 D3S1561	8%	300	3h
D2S378	6%	300	3h
D5S107	7%	200	2h
D17S1176	6%	250	3h
D17S578	7%	200	2h30min
D18S74E	8%	300	2h
APC	8%	200	2h

**Tabla 7.** Condiciones de electrofóresis de los microsatélites analizados.

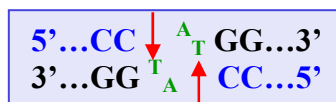
La visualización de los fragmentos se realizó mediante tinción argéntica (Bio Rad Silver Stain Kit, BIO-RAD) y la estimación del tamaño de los distintos fragmentos mediante un marcador de peso molecular: pBR322 digerido con la enzima de restricción *MspI*, con un rango de fragmentos desde 67 a 622 pb.

## 5. ANÁLISIS DEL CODON 12 DEL GEN *KRAS2*

El análisis de las mutaciones en el codon 12 del gen *KRAS2* se realizó mediante PCR-RFLP (PCR-Restriction fragment length polymorphism), utilizando la técnica descrita por Kahn *et al.* (1991), con modificaciones. Esta técnica supone un método rápido, sensible y no-radioactivo para la detección de las mutaciones puntuales, y consiste en la introducción de una diana de restricción en la secuencia amplificada del gen, que será posteriormente reconocida y cortada mediante la enzima de restricción *BstMI*. Dicha diana no aparece en la secuencia del codon 12 del gen *KRAS2*, ni la normal ni la mutante, pero sí una secuencia muy parecida. Mediante esta técnica se consigue crear la diana en cuestión en el alelo normal del gen, originando de este modo una diferencia entre el alelo normal y el mutante, lo que permite posteriormente distinguir cada uno de ellos:

<b>Codones:</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>Alelo normal:</b>	5'...GGA	GCT	GGT...3'
<b>Cebador ampliado:</b>	5'...GGA	CCT	...3'

La diana de restricción de *Bst*NI es la siguiente:



*Bst*NI reconoce la secuencia de ADN de 5 pb y corta en bisel entre las dos citosinas (C) y la tercera base del codon 11 que puede ser una adenina (A) o una timina (T), mientras que las dos primeras guaninas (G) del codon 12 complementan la diana así generada. En caso que existan cambios en cualquiera de estas bases, *Bst*NI no reconocerá la diana de restricción y por lo tanto no podrá cortar la secuencia mutada. El codon 12 de la secuencia normal del gen *KRAS2* (GGT) codifica para una glicina (Gly) y cualquier cambio en las dos primeras bases del codon producirán una proteína alterada, mientras que las mutaciones en la tercera base no producirán ningún efecto ya que son silenciosas (todos los codones con G en las dos primeras bases producen Gly independientemente de la tercera base). Los cebadores utilizados durante esta primera ronda de PCR son: Ras-1 y Ras-2, produciendo un fragmento de 157pb. La secuencia de los cebadores y las condiciones de PCR están detalladas a continuación. Con el cebador Ras-1 se introduce la base cambiada con el fin de crear “la mitad” de la diana de restricción. Ésta última puede ser que se complemente o no, dependiendo del individuo portador de la secuencia a copiar mediante la PCR:

- Si el individuo es normal, la diana de restricción se completa y por lo tanto será reconocida por la enzima *Bst*NI y cortada en dos fragmentos de 29pb y 128pb.
- Si el individuo es portador de una mutación en las 2 primeras bases del codon 12, la diana de restricción no se completará y por consiguiente el fragmento amplificado quedará sin digerir (157pb).

Con el fin de optimizar los resultados finales, los fragmentos de ADN obtenidos tras la primera digestión son sometidos a una segunda ronda de amplificación/digestión. En esta segunda PCR, los cebadores Ras-1 y Ras-3 se emplean a mayor concentración que en la primera ronda de PCR. Ras-2 y Ras-3 son dos cebadores de igual longitud (20 mer), cuyas secuencias se diferencian únicamente en la base 17. Ras-2 es el cebador con la secuencia normal, mientras que Ras-3 sirve para introducir una segunda mutación, con el fin de crear una segunda diana de restricción de la enzima *Bst*NI, dando lugar a los siguientes fragmentos:

- **Alelo normal:** 114pb, 29pb y 14pb.
- **Alelo mutante:** 143pb y 14pb.

De este modo, se puede apreciar con más claridad la diferencia entre los fragmentos digeridos y no. Además, esta segunda ronda de PCR sirve de control interno de las amplificaciones y las digestiones. Para evitar que el cebador Ras-3, que no es tan específico de la secuencia intrónica, se una a otras secuencias generando amplificaciones no-específicas, la PCR se realizó en condiciones más restringidas, aumentando en 3°C la temperatura de reasociación. Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

**Ras-1:** 5' ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT 3'  
**Ras-2:** 5' TCA AAG AAT GGT CCT GCA CC 3'  
**Ras-3:** 5' TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC 3'

La primera PCR se llevó a cabo en un volumen total de 10 µl, añadiendo 200 ng de ADN, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,08 µM del cebador Ras-1, 0,04 µM del cebador Ras-2, 0,8 unidades de *Tth* polimerasa y tampón específico de *Tth*. Cada mezcla de reacción se cubrió con aceite mineral (Mineral Oil, SIGMA) y la amplificación se llevó a cabo en el termociclador: Perkin Elmer Cetus 480.0 en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización: 94°C – 48s
  - Reasociación: 56°C – 90s
  - Extensión: 72°C – 2min – 35s
- } 15 ciclos.

Para evitar la aparición de falsos positivos, en los últimos pacientes analizados y en las muestras repetidas, la temperatura de reasociación se elevó de 56°C a 59°C. A continuación, los productos de esta primera ronda de PCR se sometieron a digestión enzimática con *Bst*NI, en un volumen total de 10 µl, añadiendo:

- 2,5 µl de producto de amplificación.
- 100 µg/ml de BSA.
- 1 unidad de enzima *Bst*NI (New England Biolabs).
- 1 µl de NEBuffer 2 (New England Biolabs).

La mezcla de reacción se incubó a una temperatura de 60°C, durante 2 horas. Como control de la digestión, se digirió el plásmido pBR322 con *Bst*NI, obteniendo 6 fragmentos de ADN (13pb, 121pb, 383pb, 929pb, 1058pb y 1857pb).

La segunda PCR se realizó partiendo de 10 µl del producto digerido de la primera PCR, en un volumen total de 25 µl, añadiendo 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,4 µM de cada uno de los cebadores Ras-1 y Ras-3, 2 unidades de *Tth* polimerasa y tampón específico de ésta. Igual que en la primera PCR, cada mezcla de reacción fue cubierta de aceite mineral (Mineral Oil, SIGMA) y la amplificación se llevó a cabo en el termociclador Perkin Elmer Cetus 480.0, en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización: 94°C – 48s
  - Reasociación: 59°C – 90s
  - Extensión: 72°C – 2min35s
- } 30 ciclos.

En esta ocasión la temperatura de reasociación empleada fue de 59°C al lugar de 56°C, con el fin de restringir las condiciones de PCR y obtener una amplificación más específica. Al final de esta segunda ronda de PCR se obtiene una gran cantidad del producto amplificado lo que facilita su visualización en los geles de poliacrilamida después de teñirlos. Después de esta segunda PCR, los productos de amplificación se han digerido con *Bst*NI, en un volumen total de 20 µl, en las siguientes condiciones:

- 10 µl de producto de la segunda amplificación.
- 100 µg/ml de BSA.
- 2 unidades de enzima *Bst*NI (New England Biolabs).
- 2 µl de NEBuffer 2 (New England Biolabs).

La mezcla de reacción se volvió a incubar en una temperatura de 60°C, durante 2 horas. A continuación los productos de la segunda digestión enzimática se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, continuos y verticales al 8%. El tampón de recorrido utilizado fue el TBE (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM y EDTA 2 mM; pH 8.2). En los geles se cargó una cantidad de 6 µl del producto de la segunda digestión con el tampón de carga: 6XBC (Bromofenol blue 0,25%; xilencianol 0,25%, glicerol 30% y EDTA 30mM). Las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente con un voltaje de 250-300V durante 1h30min. La visualización de los fragmentos se realizó mediante tinción argéntica (Bio Rad Silver Stain Kit, BIO-RAD) y la estimación del tamaño de los distintos fragmentos mediante el marcador de peso molecular pBR322 digerido con la enzima de restricción *Msp*I.

Las muestras que presentaron mutaciones durante el análisis se secuenciaron para confirmar el resultado, además de algunas muestras de individuos normales como control. Para la secuenciación se amplificó el exon 1 del gen *KRAS2* mediante PCR utilizando el cebador Ras-2 y Ras-4, cuya secuencia se detalla a continuación:

**Ras-4: 5' ACT GAA TAT AAA CTT GTG 3'**



## 6. ANÁLISIS DE LOS MUTADORES SECUNDARIOS

### ANÁLISIS DE *TGFBR2*

El análisis de las mutaciones en el gen del receptor 2 del factor de crecimiento celular TGF $\beta$  se llevó a cabo mediante PCR de tipo SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*), descrita por Lu *et al.* (1995), con modificaciones. Se analizaron 2 regiones del gen *TGFBR2* incluyendo repeticiones del mononucleótido (A) y del dinucleótido (GT), diez y tres veces respectivamente:

- ***TGFBR2* (A)<sub>10</sub>**: secuencia comprendida entre el codon 97 y 153, en el exon 3 del gen.
- ***TGFBR2* (GT)<sub>3</sub>**: secuencia comprendida entre el codon 510 y 559, en el exon 7 del gen.

Las secuencias de los cebadores utilizados son las siguientes:

***TGFBR2* (A)<sub>10</sub>:**

**F:** 5' AGA TGC TGC TTC TCC AAA GTG C 3'

**R:** 5' TTG CAC TCA TCA GAG CTA CAG G 3'

***TGFBR2* (GT)<sub>3</sub>:**

**F:** 5' ACT GAG TGC TGG GAC CAC G 3'

**R:** 5' AGG AAT CTT CTC CTC CGA GC 3'

Las mezclas de reacción para amplificar ambas regiones se llevaron a cabo en las mismas condiciones: en un volumen total de 25  $\mu$ l, se añadió 100 ng de ADN, 0,1 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,4  $\mu$ M de cada cebador (de acuerdo con la zona a amplificar), 2 unidades de *Taq* polimerasa y tampón específico de ésta con 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Cada mezcla de reacción fue cubierta de aceite mineral (Mineral Oil, SIGMA) y la amplificación se llevó a cabo en el termociclador: Perkin Elmer Cetus 480.0 en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización previa: 94°C – 10min
  - Desnaturalización: 94°C – 30s
  - Reasociación: 60°C – 2min
  - Extensión: 72°C – 1min
  - Extensión adicional: 72°C – 6min
- } 35 ciclos.

La amplificación de *TGFBR2* (A)<sub>10</sub> genera un amplicón de 90pb y la de *TGFBR2* (GT)<sub>3</sub> uno de 123pb. A continuación, los productos de la amplificación se desnaturalizaron a 95°C durante 2 minutos, en presencia de un tampón desnaturalizante de formamida (1:1) (formamida 95%, NaOH 10mM, Bromofenol blue 0,25%; xilencianol 0,25%). Después, las muestras se introdujeron inmediatamente en hielo durante 2 minutos. Las electroforesis se llevaron a cabo mediante geles MDE al 0,5X (MDE gel solution; BMA products; Rockland; ME), a 200V, durante toda la noche y a

una temperatura de 4°C. En los geles, se cargó una cantidad de 5 µl de la mezcla preparada con el producto de PCR y el tampón de carga. La visualización de los fragmentos se realizó mediante tinción argéntica (Bio Rad Silver Stain Kit, BIO-RAD) y la estimación del tamaño de los fragmentos mediante un marcador de peso molecular pBR322 digerido con la enzima de restricción *MspI*.

## ANÁLISIS DE BAX

En el gen proapoptótico *BAX* se analizó una secuencia de 94pb incluyendo una repetición de 8Gs, situada entre el codon 38 y 41, en el exon 3. Las condiciones y los cebadores son los descritos por Rampino *et al.* (1997), con modificaciones. Las secuencias de los cebadores utilizados son las siguientes:

**F: 5' ATC CAG GAT CGA GCA GGG CG 3'**  
**R: 5' ACT CGC TCA GCT TCT TGG TG 3'**

La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl, añadiendo 100 ng de ADN, 0,1 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,4 µM de cada cebador, 2 unidades de *Taq* polimerasa y tampón específico de ésta con 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Cada mezcla de reacción fue cubierta de aceite mineral (Mineral Oil, SIGMA) y la amplificación se llevo a cabo en el termociclador Perkin Elmer Cetus 480.0 en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización previa: 94°C – 10min
  - Desnaturalización: 94°C – 30s
  - Reasociación: 55°C – 30s
  - Extensión: 72°C – 30s
  - Extensión adicional: 72°C – 6min
- } 30 ciclos.

La amplificación genera una secuencia de 94pb. A continuación, las muestras se prepararon y se cargaron en geles de MDE según las mismas condiciones descritas en el apartado anterior.

## 7. PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MSP)

La detección de la metilación en el promotor de los genes *MLH1*, *MSH2*, *P15*, *P16* y *CDHI* se realizó mediante MSP. Además de rápida, se considera está técnica como la más sensible para detectar islas CpG. Esta técnica consta de dos etapas:

1. Tratamiento del ADN a analizar con bisulfito sódico, con el fin de transformar las citosinas no metiladas de las islas CpG en uracilo (U), mediante su desaminación.

2. Amplificación de la zona del promotor a analizar por PCR (MSP), utilizando cebadores específicos de metilación. En esta etapa las bases U generadas con el bisulfito serán convertidas en timinas (T).

Las condiciones del tratamiento con bisulfito y PCR son las descritas por Herman y colaboradores (Herman *et al.*, 1996a; Herman *et al.*, 1998).

## TRATAMIENTO DEL ADN CON BISULFITO SÓDICO

El objetivo de esta etapa es producir una diferencia entre las secuencias metiladas y no-metiladas del promotor; facilitando de este modo su posterior distinción mediante PCR, usando los cebadores específicos para las secuencias metiladas (M) y las no-metiladas (U). El tratamiento con bisulfito incluye las siguientes etapas:

- **Desnaturalización del ADN:** Se añade NaOH 2 M al ADN diluido en agua destilada (2 µg/50 µl) y se incuba a 37°C durante 10 minutos. A continuación se añade hidroxiquinona 10 mM (SIGMA), recién preparada, con el fin de impedir la oxidación de los intermediarios formados a lo largo del proceso.
- **Transformación de las C no metiladas en U:** Se añade bisulfito sódico 3 M a pH 5.0, recién preparado (SIGMA), incubando a 50°C durante 16 a 20 horas.
- **Purificación del ADN tratado:** Mediante el kit “Wizard DNA clean-up system” de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- **Precipitación del ADN:** Al tubo de ADN obtenido después de la purificación, se añade NaOH 3 M y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añade glicógeno 20 mg/ml (Roche), NH<sub>4</sub>Ac 10 M y tres volúmenes de etanol absoluto frío. Se vuelve a incubar durante toda la noche a -20°C. El día siguiente se centrifuga el tubo a 10.000 g durante 30 minutos y se lava con etanol frío al 70%. A continuación, se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones, se quita el sobrenadante y se deja el tubo abierto en la estufa a 37°C durante 1 minuto con el fin de secar el pellet. Al final se resuspende el ADN modificado en 20 µl de agua estéril y se guarda a -20°C hasta el momento de su utilización.

## AMPLIFICACIÓN DEL ADN MODIFICADO MEDIANTE MSP

Los cebadores utilizados para evaluar el estado de metilación en el promotor de los genes *P15*, *P16* y *CDH1* son los descritos por Herman y colaboradores (Herman *et al.*, 1996a), y para el promotor de los genes *MLH1* y *MSH2* son los descritos por el mismo grupo (Herman *et al.*, 1998) (Tabla 8). Estos cebadores, además de poder diferenciar entre los alelos metilados y no-metilados del promotor, permiten igualmente diferenciar entre las secuencias que han sido tratadas con bisulfito y las que no. Por ello, se diseñaron de tal modo a que la zona flanqueada contenga la mayor frecuencia posible de bases C y que las islas CpG estén más concentradas en la extremidad 3'OH del cebador, permitiendo tener la mayor especificidad posible y así evitar la aparición de falsos positivos. Por otra parte, la longitud de los cebadores se ajustó para obtener unas temperaturas de desnaturalización/reasociación muy aproximadas, permitiendo analizar en el mismo programa de PCR ambas reacciones: metilada y no-metilada. La diferencia en el tamaño de los cebadores permite

igualmente crear una diferencia en cuanto a la longitud de los amplicones, facilitando de este modo su posterior visualización mediante electroforesis.

Las secuencias de los cebadores metilados (M) y no-metilados (U) junto a las temperaturas de reasociación y los amplicones generados están resumidas en la Tabla 8.

Gen	cebadores	Amplicon (pb)	T° reasoc.
<b>MLH1</b>	UF: 5' TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT 3'	124	59°C
	UR: 5' ACCACCTCATC ATAACCTACCCACA 3'		
	MF: 5' ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC 3'	115	
	MR: 5' CCTCATCGTAACTACCCGCG 3'		
<b>MSH2</b>	UF: 5' GGTGTTGTGGTTGGATGTTGTTT 3'	157	60°C
	UR: 5' CAACTACAACATCTCCTTCAACTACACCA 3'		
	MF: 5' TCGTGGTCGGACGTCGTTC 3'	157	
	MR: 5' CAACGTCTCCTTCGACTACACCG 3'		
<b>P15</b>	UF: 5' TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT 3'	154	57°C
	UR: 5' CCATACAATAACCAACAACCAA 3'		
	MF: 5' GCGTTCGTATTTTGC GGTT 3'	148	
	MR: 5' CGTACAATAACCGAACGACCGA 3'		
<b>P16</b>	UF: 5' TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT 3'	151	60°C
	UR: 5' CAACCCCAAACCAACAACATAA 3'		
	MF: 5' TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC 3'	150	
	MR: 5' GACCCCGAACCGCGACCGTAA 3'		
<b>CDH1</b>	UF: 5' TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT 3'	97	55°C
	UR: 5' CACAACCAATCAACAACACA 3'		
	MF: 5' TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT 3'	116	
	MR: 5' TAACTAAAAATTCACCTACCGAC 3'		

**Tabla 8.** Secuencias de los cebadores utilizados en la MSP, sus temperaturas de reasociación y los amplicones generados.

La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl, añadiendo 2 µl del ADN anteriormente modificado con bisulfito, 1,25 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 300 ng/reacción de cada cebador, tampón específico de la polimerasa al 1X (sin MgCl<sub>2</sub>) y MgCl<sub>2</sub> 6,7 mM. La mezcla de reacción se cubrió con aceite mineral (Mineral Oil, SIGMA) y se desnaturizó durante 5 minutos a una temperatura de 95°C antes de añadir la polimerasa (*Hot-Start*). A continuación se añadió a los tubos de PCR 1,25 unidades de la mezcla de *Tth* polimerasa diluida en 10 µl de agua estéril. La amplificación se realizó en el termociclador: Perkin Elmer Cetus 480.0, cada mezcla de reacción en el programa adecuado.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- Desnaturalización: 95°C – 30s
  - Reasociación: 30s (T° adecuada para cada cebador)
  - Extensión: 72°C – 30s
  - Extensión adicional: 72°C – 6min
- } 35 ciclos.

Como control negativo de MSP se utilizó ADN normal sin tratar, mientras que como control positivo se utilizó ADN de controles sanos tratados con *SssI* metil-transferasa (New England

BioLabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación los productos de PCR se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes, continuos y verticales al 8%. El tampón de recorrido utilizado fue el TBE (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM y EDTA 2 mM; (pH 8.2)). En los geles se cargó una cantidad de 5 µl del producto de amplificación, con el tampón de carga: 6XBC (Bromofenol blue 0,25%; xilencianol 0,25% y glicerol 30%). Todas las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con un voltaje de 450V durante 2 horas. La visualización de los fragmentos se realizó mediante tinción argéntica (Bio Rad Silver Stain Kit, BIO-RAD) y la estimación del tamaño de los distintos fragmentos mediante el marcador de peso molecular pBR322 digerido con la enzima de restricción *MspI*.

## 8. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN *MLH1*

En el gen *MLH1* se analizaron tres SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) situados en el exon 5 (415G>C, rs28930073), en el exon 8 (655A>G, rs1799977) y en el exon 16 (1852-1853 AA>GC), en los grupos de pacientes y controles.

### POLIMORFISMO G415C (*MLH1* D132H)

*MLH1* G415C (rs28930073) es un polimorfismo de nucleótido sencillo situado en el nucleótido 415 (exon 5) del gen *MLH1*, responsable del cambio de un ácido aspártico por una histidina en el codon 132: GAT→CAT (D132H).

Para analizar este polimorfismo se utilizó la técnica PCR-RFLP. Los cebadores utilizados para amplificar la zona a analizar se diseñaron con el programa “Primer3”: [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Debido al pequeño tamaño del exon 5 (73 nucleótidos), los cebadores se diseñaron de tal manera que el fragmento amplificado (160 pb) incluía parte de los intrones 4 y 5.

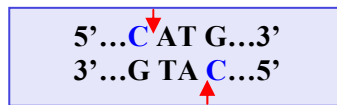
Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

**F: 5' TCTCTTTTCCCCTTGGGATT 3'**  
**R: 5' TCCCATGTACCATTCTTACCG 3'**

La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl, añadiendo 100 ng de ADN genómico, 0,1 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,4 µM de cada cebador, 1 unidad de *Tth* polimerasa y tampón específico de *Tth* con 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se cubrió con aceite mineral (Mineral Oil, SIGMA) y la amplificación se llevo a cabo en el termociclador: Perkin Elmer Cetus 480.0, en las siguientes condiciones:

- Desnaturalización previa: 94°C – 6min
  - Desnaturalización: 94°C – 30s
  - Reasociación: 54°C – 1min
  - Extensión: 72°C – 1min
  - Extensión adicional: 72°C – 6min
- } 35 ciclos.

A continuación los productos de la amplificación se sometieron a la digestión enzimática. El cambio nucleotídico: G>C en la posición 415 genera una diana de restricción para la enzima *CviA* II:



Además de esta diana de restricción, que puede existir o no, dependiendo del individuo, la secuencia amplificada contiene dos dianas más, lo que hace que el número de fragmentos generados por el corte dependa de la secuencia analizada:

- En un homocigoto normal, se encuentran dos dianas de restricción de la enzima *CviA* II, lo que genera tres fragmentos de 6 pb, 44 pb y 110 pb.
- En un homocigoto polimórfico, la enzima corta por tres sitios distintos generando así cuatro fragmentos de 6 pb, 28 pb, 44 pb y 82 pb.
- En un individuo heterocigoto, los fragmentos generados serán de 6 pb, 28 pb, 44 pb, 82 pb y 110 pb.

La digestión enzimática se llevó a cabo a partir de 25 µl del producto de PCR, añadiendo 5 unidades de *CviA*II (New England BioLabs) y tampón específico de la enzima siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a una temperatura de 25°C. El día siguiente los productos de la digestión se separaron en geles de poliacrilamida no desnaturizantes, continuos y verticales al 8%. Como tampón de recorrido se utilizó TBE (Tris 90 mM; Ácido Bórico 90 mM y EDTA 2 mM; (pH 8.2)). En los geles se cargaron 10 µl del producto de digestión, con el tampón de carga: 6XBC (Bromofenol blue 0,25%; xilencianol 0,25% y glicerol 30%). Todas las electroforesis se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con un voltaje de 500V durante 2 horas. Como control de la digestión se cargó en los geles una muestra del producto de amplificación sin cortar. La estimación del tamaño de los fragmentos se realizó mediante el marcador de peso molecular: pBR322 digerido con la enzima de restricción *Msp*I. La visualización de los fragmentos se realizó mediante tinción argéntica (Bio Rad Silver Stain Kit, BIO-RAD). Los fragmentos de 6 pb y 28 pb no se pudieron detectar en los geles, debido al pequeño tamaño de éstos.

### **POLIMORFISMO A1852G/A1853C (*MLH1* K618A)**

El polimorfismo K618A consiste en un cambio dinucleotídico afectando las bases 1852 y 1853, en el exon 16 del gen *MLH1* (AAG → GCG). Este cambio es responsable de la sustitución de una lisina por una alanina en la posición 618 de *MLH1*. Las condiciones y los cebadores de la PCR-RFLP utilizada para analizar este polimorfismo son los descritos por Liu y colaboradores, con

modificaciones (Liu *et al.*, 1999). El proceso consistió en amplificar una secuencia de 247 pb incluyendo el exon 16 y parte de los intrones 15 y 16 con los siguientes cebadores:

**F: 5' CATTGGATGCTCCGTTAAAG 3'**

**R: 5' ACAACAGAAGTATAAGAATGGCTGTC 3'**

Las condiciones de PCR son las mismas utilizadas para la amplificación del polimorfismo *MLHI* D132H (rs28930073), detalladas en el apartado anterior. El producto amplificado se digirió con *Fnu*4HI. Esta enzima reconoce una diana de 5 pb y corta en bisel tras las bases G y C que constituyen el polimorfismo. Por lo tanto, si se produce un cambio nucleotídico únicamente en una base de las dos, *Fnu*4HI no reconocerá la diana y por consiguiente no producirá ningún corte. La diana de restricción de *Fnu*4HI es la siguiente:



El corte de la enzima produce los siguientes fragmentos, dependiendo del individuo analizado:

- Homocigoto normal: la enzima no encuentra la diana de restricción quedando íntegro el fragmento amplificado: 247 pb
- Homocigoto polimórfico: el corte de la enzima produce 2 fragmentos: 73 pb y 174 pb.
- Heterocigoto: 73 pb, 174 pb y 247 pb.

La digestión enzimática se llevó a cabo a partir de 10 µl del producto amplificado, añadiendo 3 unidades de *Fnu*4HI (New England BioLabs) y tampón específico de ésta, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción se incubó a una temperatura de 37°C durante toda la noche. Al día siguiente el producto de la digestión enzimática se separó y se visualizó siguiendo los mismos pasos detallados en el apartado anterior. En todos los geles se incluyeron muestras de control positivo y negativo de la digestión enzimática.

### **POLIMORFISMO A655G (*MLHI* I219V)**

*MLHI* A655G (rs1799977) es un polimorfismo de nucleótido sencillo producido por el cambio de una adenina por una guanina en el nucleótido 655, en el exon 8 del gen *MLHI* (ATC → GTC), originando la sustitución de una isoleucina por una valina en el codon 219. El método utilizado para estudiar este SNP es la AS-PCR (*Allele-specific PCR*) descrito por Newton *et al.* (1989) y Okayama *et al.* (1989), con modificaciones. Se trata de una técnica sencilla, rápida y no-radioactiva para la detección directa de las mutaciones puntuales, que consiste básicamente en la

utilización de dos cebadores “*Reverse*” y un cebador “*Forward*”. Los cebadores *reverse* se diseñan de tal manera que la última base del extremo 3’OH cambie según la base polimórfica analizada, generando de esta manera una complementariedad con un alelo u otro. De este modo, cuando la última base del cebador es complementaria a la base polimórfica, la secuencia consigue amplificar y se genera un amplicón. En cambio, si esta complementariedad está ausente no se genera ninguno.

En nuestro caso se modificó la técnica, para aumentar la especificidad y diferenciar también por longitudes a los amplicones, quedando finalmente como sigue:

Los dos cebadores *reverse* diseñados son:

- Cebador *reverse* normal “**RN**”, con una “T” en la última base de la extremidad 3’OH, complementaria a la base normal “A”.
- Cebador *reverse* polimórfico “**RP**”, con una “C” en la extremidad 3’OH de éste, complementaria a la base polimórfica “G”.

Para dificultar más el apareamiento del cebador “RP” con la secuencia normal y evitar la aparición de falsos positivos, la penúltima base del extremo 3’OH del cebador también se modificó. Asimismo, se diseñaron dos cebadores “*forward*”: “**FN**” y “**FP**” con el objetivo de crear una diferencia en cuanto a la longitud de los amplicones, facilitando de este modo su posterior visualización mediante la electroforesis. Así pues, se utilizaron al final dos parejas de cebadores:

- **FN** y **RN**: para amplificar la secuencia normal, generando un amplicón de 221 pb.
- **FP** y **RP**: para amplificar la secuencia polimórfica, generando un amplicón de 227 pb.

Las secuencias de los cebadores son las siguientes:



La PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl, en las mismas condiciones utilizadas para amplificar los polimorfismos D132H (rs28930073) y K618A. En cuanto a la amplificación, ésta se realizó en las siguientes condiciones:

- |   |                                       |             |
|---|---------------------------------------|-------------|
| • | Desnaturalización previa: 94°C – 6min | } 35ciclos. |
| • | Desnaturalización: 94°C – 30s         |             |
| • | Reasociación: 65°C – 1min             |             |
| • | Extensión: 72°C – 1min                |             |
| • | Extensión adicional: 72°C – 6min      |             |

A continuación, los productos de la amplificación se separaron y se visualizaron siguiendo los mismos pasos detallados en los apartados anteriores.



## 9. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

Los geles se analizaron por densitometría, con el densitómetro de imagen GS-690 (BIO-RAD), mediante el programa *Molecular Analyst Software* (Bio Rad) y *Excel Software* (Microsoft). Se han analizado dos parámetros: la migración y la densidad de las bandas de ADN, en las muestras del tumor y el tejido normal o la sangre (en los pacientes). La densidad relativa de los 2 alelos de cada muestra del tumor ha sido comparada con la densidad relativa de los mismos en la muestra de sangre o mucosa normal.

La LOH ha sido determinada mediante la ecuación:  $L = (T2 \times N1) / (T1 \times N2)$ , de tal manera que N1, N2, T1 y T2, representan las densidades de los alelos 1 y 2, en el tejido normal o la sangre y el tejido tumoral, respectivamente. Cuando:  $0,6 < L < 1,67$ , en este caso uno de los alelos sufre más de 40% de LOH.

Por otra parte, los tumores se han clasificado según la inestabilidad de microsatélites en:

- **MSI-H:** cuando el tumor presenta al menos 40% de los marcadores inestables.
- **MSI-L:** cuando el tumor presenta menos de 40% de los marcadores inestables.
- **MSS:** cuando todos los marcadores analizados en el tumor están estables.

## 10. SECUENCIACIÓN

Todas las muestras que presentaban mutaciones o una movilidad distinta en comparación con la muestra normal han sido secuenciadas para confirmar los resultados. Igualmente se han secuenciado algunas de las muestras tratadas con bisulfito para confirmar la transformación de las “C” no metiladas en “U”.

Las muestras se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores correspondientes a cada secuencia. A continuación, los productos de la amplificación han sido separados en geles de agarosa “*Low melting*” (BIO- RAD) al 2%, teñidos mediante bromuro de etidio. Después de visualizar los geles, las bandas amplificadas se purificaron mediante el *kit* de purificación de ADN: “*Wizard DNA clean-up system*” de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del ADN purificado se estimó mediante el espectrofotómetro GeneQuant II (Pharmacia Biotech).

Las muestras se secuenciaron mediante el secuenciador ABI PRISM™ de Perkin Elmer, modelo 377 del Servicio de Secuenciación del S.I.D.I. de la Facultad de Ciencias (UAM). En algunas ocasiones, las muestras han sido igualmente secuenciadas mediante el sistema ABI Prism (Applied Biosystems) de terminadores fluorescentes Big Dye™ y el aparato de electroforesis multicapilar ABI 3700 del Servicio de Secuenciación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

## 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística de no-asociación entre las distintas variables se estimó mediante el análisis de chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o el test exacto de Fisher. Para la comparación de medias se ha utilizado el test de la t-Student o el análisis de la varianza (ANOVA). El análisis de la supervivencia de los pacientes respecto a las diferentes variables se realizó mediante el test de Log-Rank de las curvas de Kaplan-Meier. Se utilizaron modelos de regresión de Cox de riesgos proporcionales, para calcular los riesgos relativos (*Hazard ratios* (HR)) y los intervalos de confianza (IC) del 95%, para el polimorfismo *MLH1* A655G (rs1799977), ajustados por la edad al diagnóstico, sexo del paciente, la localización del tumor, el nivel de diferenciación, la recurrencia local, la invasión vascular y los estadios de Dukes de este. La frecuencia de los polimorfismos estudiados se evaluó en los grupos de controles y de pacientes mediante el test de equilibrio de Hardy-Weinberg. Estos análisis estadísticos han sido llevados a cabo mediante el software SPSS 16.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL). Las probabilidades se consideraron significativas cuando el valor *p* fue menor de 0,05.

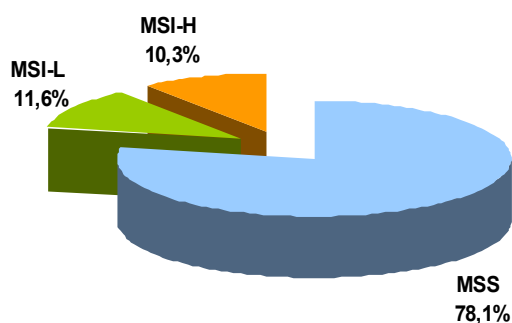
## *RESULTADOS*



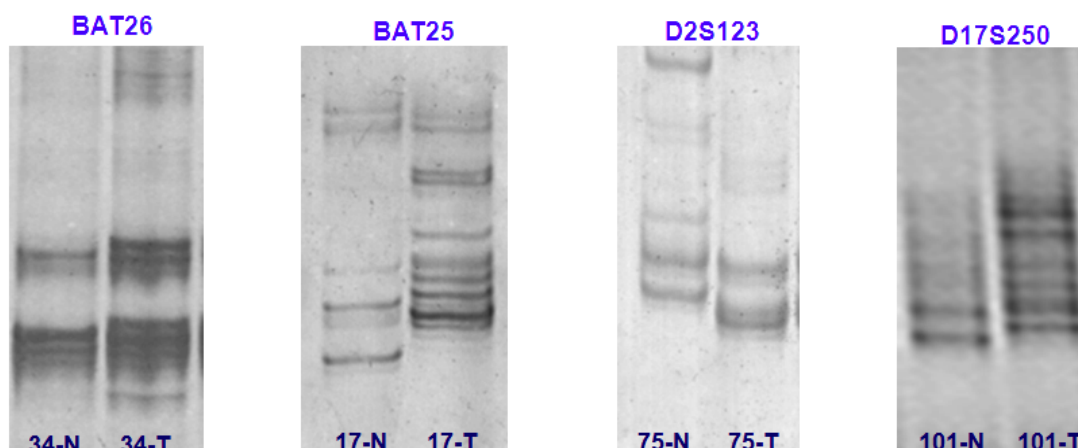
# RESULTADOS

## 1. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

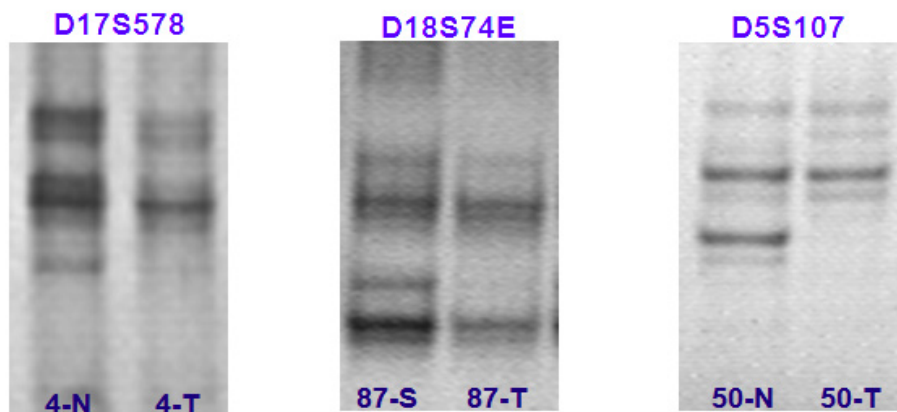
El análisis de la inestabilidad de microsatélites se realizó en las 156 muestras de ADN genómico procedente de los tumores colorrectales esporádicos de la serie, pero por problemas técnicos se obtuvo resultado final en 155 muestras. Comparando el patrón de bandas del tejido normal o la sangre con el tejido tumoral, se observó que el 10,3% de los tumores estudiados (16/155) mostraban alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H), el 11,6% de los tumores (18/155) baja inestabilidad de microsatélites (MSI-L) y el 78,1% (121/155) de los tumores eran estables (MSS). En ningún caso se observaron diferencias en el patrón de bandas de la mucosa normal y la sangre. La distribución de los tres grupos de inestabilidad en la serie de tumores estudiada está representada en la Figura 30.



**Figura 30.** Distribución de los tumores de la serie según el nivel de MSI.



**Figura 31A. Análisis de la inestabilidad de microsatélites:** Ejemplos de geles de electroforesis mostrando inestabilidad en los microsatélites BAT26, BAT25, D2S123 y D17S250. N y T: tejido normal y tumoral de los pacientes 34, 17, 75 y 101, respectivamente.



**Figura 31B. Análisis de LOH:** Ejemplos de geles de electroforesis mostrando pérdidas de heterocigosidad en los genes *TP53*, *DCC* y *APC* mediante los microsatélites D17S578, D18S74E y D5S107 respectivamente. N, T y S: tejido normal, tumoral y sangre periférica de los pacientes 4, 87 y 50 respectivamente.

## INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS

En la Tabla 9 se resumen las características clinicopatológicas de la serie estudiada en relación con el nivel de inestabilidad.

Variable	Grupos de inestabilidad			p
	MSS	MSI-L	MSI-H	
<b>Sexo</b>				
Varones	70 (79,5%)	9 (10,2%)	9 (10,2%)	ns
Mujeres	51 (76,1%)	9 (13,4%)	7 (10,4%)	
<b>Media de edad</b>	68,23 ± 11,81	66,0 ± 16,06	67,88 ± 16,65	ns
<b>Rango</b>	37 - 91	16 - 86	32 - 93	
<b>Edad</b>				
≤50 años	12 (70,6%)	2 (11,8%)	3 (17,6%)	ns
>50 años	109 (79,0%)	16 (11,6%)	13 (9,4%)	
<b>Localización</b>				
Derecha	17 (51,5%)	6 (18,2%)	10 (30,3%)	<0,001
Izquierda	104 (85,2%)	12 (9,8%)	6 (4,9%)	
<b>Estadios de Dukes</b>				
A	11 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0,07
B	38 (66,7%)	9 (15,8%)	10 (17,5%)	
C	49 (84,5%)	4 (6,9%)	5 (8,6%)	
D	23 (79,3%)	5 (17,2%)	1 (3,4%)	
<b>Grado de diferenciación</b>				
Bien	56 (80%)	8 (11,4%)	6 (8,6%)	0,05
Moderado	57 (80,3%)	9 (12,7%)	5 (7%)	
Pobre	7 (53,8%)	1 (7,7%)	5 (38,5%)	
<b>Recurrencia</b>				
No	79 (73,8%)	17 (15,9%)	11 (10,3%)	ns
Si	21 (91,3%)	0 (0%)	2 (8,7%)	
<b>Persistencia (metástasis)</b>				
No	75 (78,9%)	10 (10,5%)	10 (10,5%)	ns
Si	25 (69,4%)	7 (19,4%)	4 (11,1%)	
<b>Fenotipo mucosecretor</b>				
No	105 (82%)	11 (8,6%)	12 (9,4%)	ns
Si	7 (58,3%)	2 (16,7%)	3 (25%)	
<b>Total</b>	121/155(78,1%)	18/155(11,6%)	16/155(10,3%)	

En algunos casos no observamos un total de 121, 18 o 16 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 9.** Características clinicopatológicas de los pacientes en relación con el nivel MSI de los tumores.

La edad media de los pacientes de la serie es de 67,22 ± 12,7 años, con un rango de edad de 16 a 93 años. El paciente de 16 años es el de menor edad (el siguiente paciente en orden creciente de edad tiene 32 años). Este caso sugiere que puede tratarse de un posible caso de cáncer de tipo hereditario (pero sus familiares no concedieron la autorización para continuar los análisis de mutaciones), ya que la edad avanzada es el principal factor de riesgo en cuanto a la aparición de los tumores esporádicos, siendo tal acontecimiento poco común en menores de 40 años, mientras que su incidencia aumenta significativamente a partir de los 50-55 años de edad. Justamente, cuando se estratificó la serie en 2 grupos de edad: mayores y menores de 50 años, se observó que existen solamente 17 pacientes menores de 50 años (10,9%), frente a 138 pacientes mayores de 50 años (89%).

La estratificación de la serie en grupos de acuerdo con el grado de MSI, reveló que las medias de edad no muestran variaciones significativas entre los distintos grupos ( $p = 0,7$ ). La distribución de los grupos MSI en función de los 2 grupos de edad (mayores y menores de 50 años) reveló que la frecuencia de los tumores inestables MSI-H es mayor en el grupo de pacientes menores de 50 años (17,6%), frente a los mayores de 50 años (9,4%), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,56$ ; Tabla 9).

Treinta y tres tumores de los 155 analizados tienen una localización derecha (21,3%); mientras que los 122 tumores restantes tienen una localización izquierda (78,7%). La mayoría de los tumores MSI-H están localizados en el colon derecho (10/16: 62,5%), mientras que la mayoría de los MSS tienen una localización izquierda (104/121: 86%), lo que concuerda con la localización descrita para este tipo de tumores. Por otra parte, se observó que la mayoría de los tumores MSI-L presentan una localización izquierda (12/18: 66,7%), ( $\chi^2 = 21,5$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 9).

La distribución de los tumores de la serie en los distintos estadios de Dukes es: 7,1% (11/155) en el estadio A, 36,77% (57/155) y 37,41% (58/155) en los estadios B y C respectivamente y 18,7% (29/155) en el estadio D. Cuando se estratificó la serie en grupos MSI, se observó que todos los tumores en el estadio A son estables MSS; mientras que los tumores inestables MSI-L y MSI-H presentan una clara tendencia a aparecer en el estadio B (9/18: 50%) y (10/16: 62,5%) respectivamente ( $\chi^2 = 11,47$ ;  $p = 0,075$ ; Tabla 9).

El 45,16% (70/155) de los tumores de la serie presentan buena diferenciación, el 45,8% (71/155) diferenciación moderada y el 8,4% (13/155) son pobremente diferenciados. La mayoría de los tumores estables (MSS) son bien o moderadamente diferenciados: 46,66% (56/120) y 47,5% (57/120) respectivamente; al igual que los tumores MSI-L: 44,44% (8/18) y 50% (9/18:) respectivamente. Por otra parte, el 38,5% (5/13) de los tumores pobremente diferenciados son MSI-H ( $\chi^2 = 12,49$ ;  $p = 0,052$ ; Tabla 9).

## INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES Y CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

Un 10,52% (16/152) de los tumores analizados presenta LOH en el gen *APC*, mientras que los 89,5% (136/152) restantes no presentan esta alteración. Los tumores MSI-H presentan una frecuencia de LOH más alta que los tumores MSI-L y MSS: 33,3% (5/15), frente a 11,1% (2/18) y 7,6% (9/119) respectivamente ( $\chi^2 = 9,4$ ;  $p < 0,01$ ; Tabla 10).

Un 12% (18/150) de los tumores analizados presentan LOH en *MSH2*, frente al 8,8% (8/91) que presentan LOH en *MLH1*. Los tumores MSI-H presentan una alta frecuencia de LOH en *MSH2*: 37,5% (6/16), en comparación con los tumores MSI-L: 17,6% (3/17) y MSS: 7,7% (9/117). Esta asociación es estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 12,42$ ;  $p < 0,01$ ), mientras que no lo es en el caso de *MLH1* (Tabla 10).



No se observan más asociaciones entre los tumores con diferentes niveles MSI y las otras características genéticas de la Tabla 10.

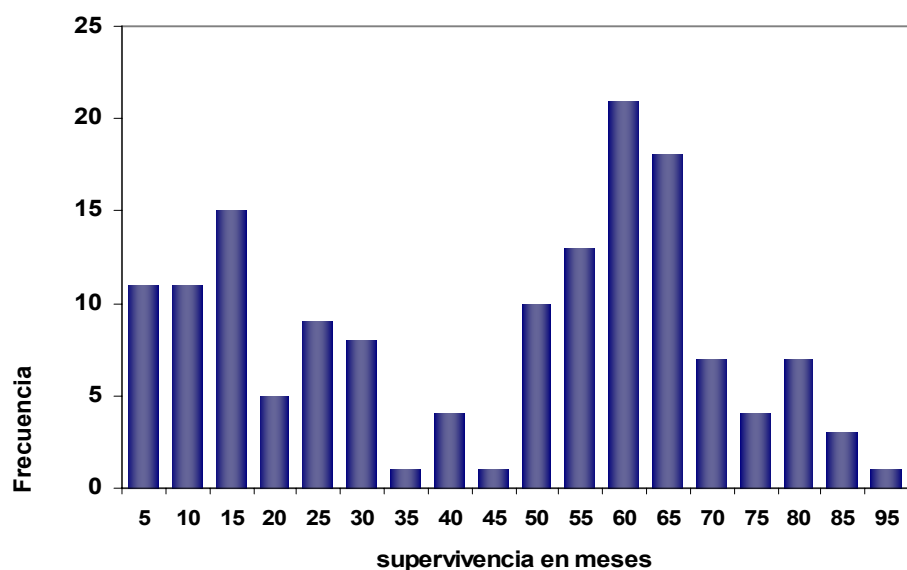
Variable	Grupos de inestabilidad			p
	MSS	MSI-L	MSI-H	
Mut <i>KRAS2</i>				
No	37 (74%)	7 (14%)	6 (12%)	ns
Si	21 (77,8%)	5 (18,5%)	1 (3,7%)	
LOH <i>TP53</i>				
No	78 (75%)	13 (12,5%)	13 (12,5%)	ns
Si	34 (81%)	5 (11,9%)	3 (7,1%)	
LOH <i>APC</i>				
No	110 (80,9%)	16 (11,8%)	10 (7,4%)	<0,01
Si	9 (56,3%)	2 (12,5%)	5 (31,3%)	
LOH <i>DCC</i>				
No	89 (78,8%)	14 (12,4%)	10 (8,8%)	ns
Si	23 (71,9%)	4 (12,5%)	5 (15,6%)	
LOH <i>MLH1</i>				
No	63 (75,9%)	12 (14,5%)	8 (9,6%)	ns
Si	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0 (0%)	
LOH <i>MSH2</i>				
No	108 (81,8%)	14 (10,6%)	10 (7,6%)	<0,01
Si	9 (50%)	3 (16,7%)	6 (33,3%)	
Total	121/155(78,1%)	18/155(11,6%)	16/155(10,3%)	

En algunos casos no observamos un total de 121, 18 o 16 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 10.** Características genéticas de los tumores en relación con los diferentes niveles de MSI.

## INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

El seguimiento de los pacientes de esta serie se ha realizado durante un tiempo medio de  $44,3 \pm 22,8$  meses, para un total de 149 pacientes. La supervivencia global media de estos pacientes es de  $40,93 \pm 24,73$  meses, con un tiempo máximo de 90 meses y una mediana de 49 meses (Figura 32).



**Figura 32.** Supervivencia global de los pacientes de la serie estudiada en meses.

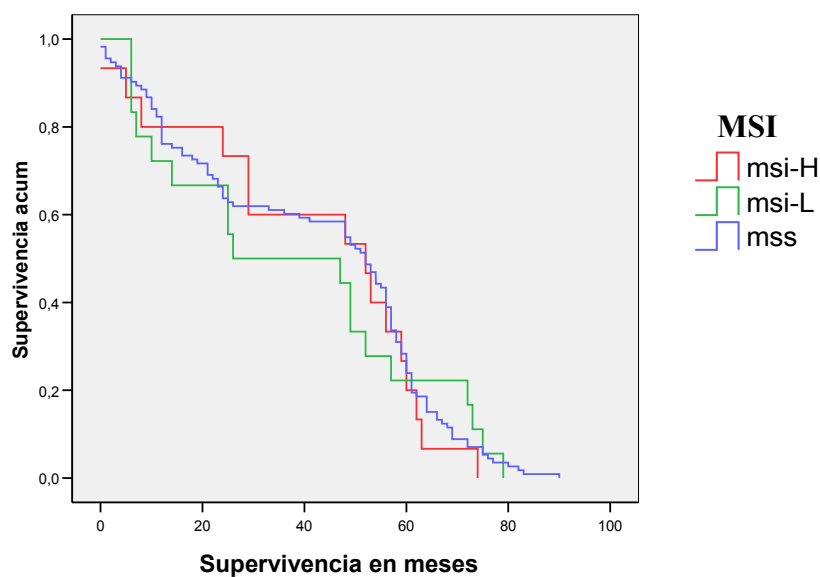
Existe muy poca diferencia en cuanto a las medias de supervivencia entre los grupos MSI, siendo MSI-L el grupo que muestra la supervivencia más baja con una media de  $37,67 \pm 26,77$  meses y un tiempo máximo de 79 meses; seguido por el grupo MSI-H con una media de supervivencia de  $40,06 \pm 23,59$  meses y un tiempo máximo de 74 meses; y al final el grupo MSS con la supervivencia más alta de  $41,58 \pm 24,85$  meses y un tiempo máximo de 90 meses; aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,8$ ; Tabla 11).

MSI	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
MSS (114)	$41,58 \pm 24,85$	68/114 (59,64%)	27/114 (23,68%)
MSI-L (18)	$37,67 \pm 26,77$	9/18 (50%)	4/18 (22,22%)
MSI-H (16)	$40,06 \pm 23,59$	9/16 (56,25%)	3/16 (18,75%)
<b>Total (148)</b>	$40,93 \pm 24,73$	86/148 (58,1%)	34/148 (22,97%)

Se observa un total de 148 casos en el lugar de 149 por la existencia de un caso perdido.

**Tabla 11.** Supervivencia de los pacientes en los tres grupos MSI.

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier tampoco muestran diferencias significativas en cuanto a la supervivencia entre los 3 grupos MSI, aunque se observa que el grupo MSI-L muestra, una ligera peor supervivencia en comparación con los grupos MSS y MSI-H (log rank  $P = 0,85$ ; Figura 33).

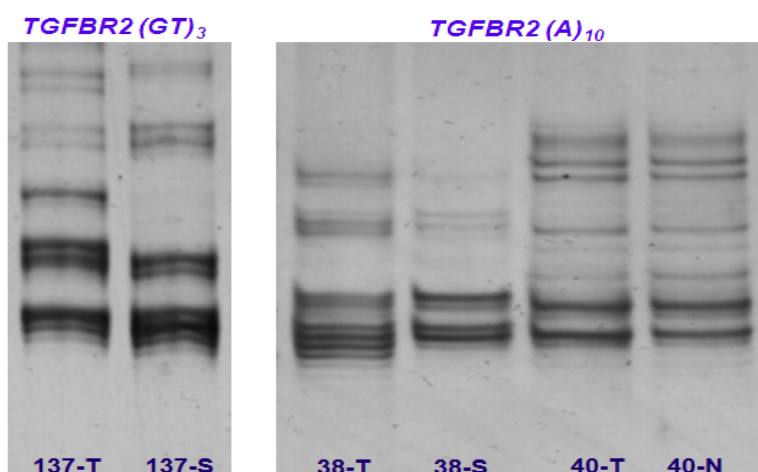


**Figura 33.** Curva Kaplan- Meier de supervivencia de los pacientes en función de los grupos MSI.

## 2. ANÁLISIS DE LOS MUTADORES SECUNDARIOS

### GEN *TGFBR2*

En el presente estudio se analizaron 2 regiones del gen *TGFBR2*: (A)<sub>10</sub> y (GT)<sub>3</sub> mediante PCR-SSCP en las muestras de ADN genómico de 155 pacientes de nuestra serie; se han considerado mutados aquellos individuos que presentan mutaciones en cualquiera de las dos regiones. De este modo, se han detectado mutaciones en 14 individuos de los 155 analizados (9,03%), mientras que los 141 restantes (90,96%) no presentan mutaciones.



**Figura 34.** Análisis de las mutaciones en las regiones (GT)<sub>3</sub> y (A)<sub>10</sub> del gen *TGFBR2*: Ejemplos de geles de electroforesis mostrando una mutación en la región (GT)<sub>3</sub> del paciente 137 y de la región (A)<sub>10</sub> del paciente 38; mientras que el paciente 40 muestra un patrón normal. N, T y S: tejido normal, tumoral y sangre periférica.

## MUTACIONES EN *TGFBR2* Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS

Trece de las 14 mutaciones detectadas en *TGFBR2* (92,9%) se observaron en pacientes mayores de 50 años, aunque tal hecho no es estadísticamente significativo ( $p = 1,0$ ; Tabla 12). Sin embargo, sí resulta significativo que el 64,3% (9/14) de los tumores portadores de mutaciones en *TGFBR2* presenten una localización derecha, en comparación con 5 tumores en el colon izquierdo (35,7%;  $\chi^2 = 16,29$ ;  $p < 0,001$ ).

Variable	Mutaciones en <i>TGFBR2</i>		p
	No	Si	
<b>Sexo</b>			
Varones	81 (93,1%)	6 (6,9%)	ns
Mujeres	60 (88,2%)	8 (11,8%)	
<b>Media de edad</b>	67,8 $\pm$ 1,1 años	69,6 $\pm$ 4,1 años	ns
<b>Edad</b>			
$\leq 50$ años	16 (94,1%)	1 (5,9%)	ns
$> 50$ años	126 (90,6%)	13 (9,4%)	
<b>Localización</b>			
Derecha	25 (73,5%)	9 (26,5%)	<0,001
Izquierda	116 (95,9%)	5 (4,1%)	
<b>Estadios de Dukes</b>			
A	11 (100%)	0 (0%)	0,045
B	48 (82,8%)	10 (17,2%)	
C	54 (94,7%)	3 (5,3%)	0,036
D	28 (96,6%)	1 (3,4%)	
A+B	59 (85,5%)	10 (14,5%)	
C+D	82 (95,3%)	4 (4,7%)	
<b>Grado de diferenciación</b>			
Bien	65 (92,9%)	5 (7,1%)	0,002
Moderado	68 (94,4%)	4 (5,6%)	
Pobre	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
<b>Recurrencia local</b>			
No	125 (90,6%)	13 (9,4%)	ns
Si	16 (94,1%)	1 (5,9%)	
<b>Persistencia (metástasis)</b>			
No	102 (90,3%)	11 (9,7%)	ns
Si	39 (92,9%)	3 (7,1%)	
<b>Invasión vascular</b>			
No	123 (93,2%)	9 (6,8%)	0,03
Si	18 (78,3%)	5 (21,7%)	
<b>Fenotipo mucosecretor</b>			
No	117 (90,7%)	12 (9,3%)	ns
Si	11 (84,6%)	2 (15,4%)	
<b>Total</b>	141/155 (90,96%)	14/155 (9,03%)	

**Tabla 12.** Características clinicopatológicas de los tumores con mutaciones en *TGFBR2*.

El 71,4% (10/14) de los tumores portadores de mutaciones en el gen *TGFBR2* están en el estadio B de Dukes, el 21,4% (3/14) en el estadio C y el 3,4% (1/14) en el estadio D ( $\chi^2 = 8,04$ ;  $p = 0,045$ ). Cuando agrupamos los tumores en los estadios de Dukes A+B y C+D, observamos que los tumores en el estadio temprano de desarrollo A+B presentan una alta frecuencia de mutaciones en *TGFBR2* (14,5%), en comparación con los tumores del estadio tardío C+D (4,7%;  $\chi^2 = 4,38$ ;  $p = 0,036$ ; Tabla 12).

Los tumores con mutaciones en *TGFBR2* están uniformemente distribuidos entre los 3 grupos establecidos en relación con la diferenciación tumoral. Sin embargo, cuando comparamos la presencia de mutaciones en cada uno de los grupos de diferenciación, observamos que los tumores pobremente diferenciados muestran una alta frecuencia de mutaciones (38,5%: 5/13) frente a los tumores moderadamente y bien diferenciados (5,6%: 4/72 y 7,1%: 5/70 respectivamente) ( $\chi^2 = 15,25$ ;  $p = 0,002$ ; Tabla 12). Los tumores que presentan invasión vascular muestran una frecuencia más alta de mutaciones en el gen *TGFBR2* (21,73%: 5/23), frente a los tumores que no presentan esta característica (6,8%: 9/132) ( $\chi^2 = 7,64$ ;  $p = 0,03$ ; Tabla 12).

## MUTACIONES EN *TGFBR2* Y CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

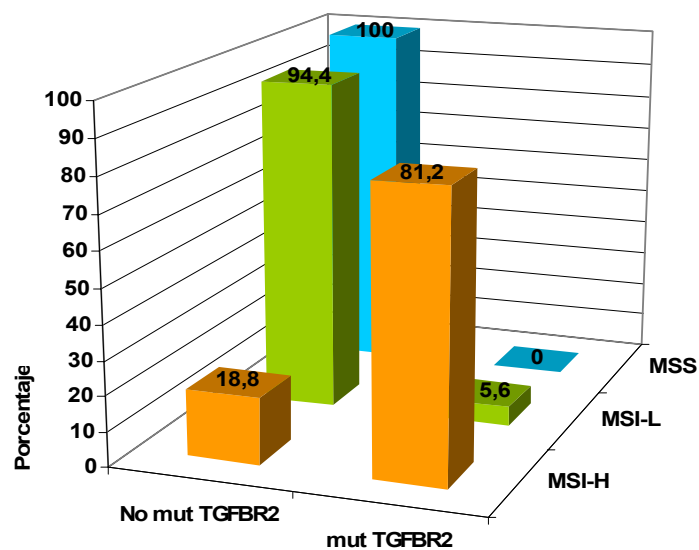
La Tabla 13 resume las relaciones entre los tumores analizados en función de las mutaciones en *TGFBR2* con otras características genéticas.

Existe una asociación positiva entre la presencia de mutaciones en *TGFBR2* y el nivel de inestabilidad de microsatélites: ningún tumor MSS de los 121 analizados muestra mutaciones en *TGFBR2* y existe un sólo tumor MSI-L con *TGFBR2* mutado, mientras que 13 tumores MSI-H presentan esta alteración (1/18: 5,6% y 13/16: 81,2% respectivamente) ( $\chi^2 = 48,51$ ;  $p < 0,001$ ). Cuando comparamos los grupos de tumores estables (MSS+MSI-L) frente a los inestables MSI-H, observamos que esta diferencia se sigue manteniendo estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 48,41$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 13 y Figura 35).

No se observaron otras asociaciones significativas entre la presencia de mutaciones en *TGFBR2* y las demás variables genéticas (Tabla 13).

Variable	Mutaciones en <i>TGFBR2</i>		p
	No	Si	
<b>MSI</b>			
MSS	121 (100%)	0 (0%)	<0,001
MSI-L	17 (94,4%)	1 (5,6%)	
MSI-H	3 (18,8%)	13 (81,2%)	
<b>MSI</b>			
MSS+MSI-L	138 (99,3%)	1 (0,7%)	<0,001
MSI-H	3 (18,8%)	13 (81,2%)	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>			
No	89 (89%)	11 (11%)	ns
Si	52 (94,5%)	3 (5,5%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>			
No	101 (89,4%)	12 (10,6%)	ns
Si	40 (95,2%)	2 (4,8%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>			
No	128 (92,1%)	11(7,9%)	ns
Si	13 (81,2%)	3 (18,8%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>			
No	113 (91,9%)	10 (8,1%)	ns
Si	28 (87,5%)	4 (12,5%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>			
No	128 (90,8%)	13 (9,2%)	ns
Si	13 (92,9%)	1 (7,1%)	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>			
No	126 (92%)	11 (8%)	ns
Si	15 (83,3%)	3 (16,7%)	
<b>Total</b>	141/155 (90,96%)	14/155 (9,03%)	

**Tabla 13.** Características genéticas de los tumores con mutaciones en *TGFBR2*.



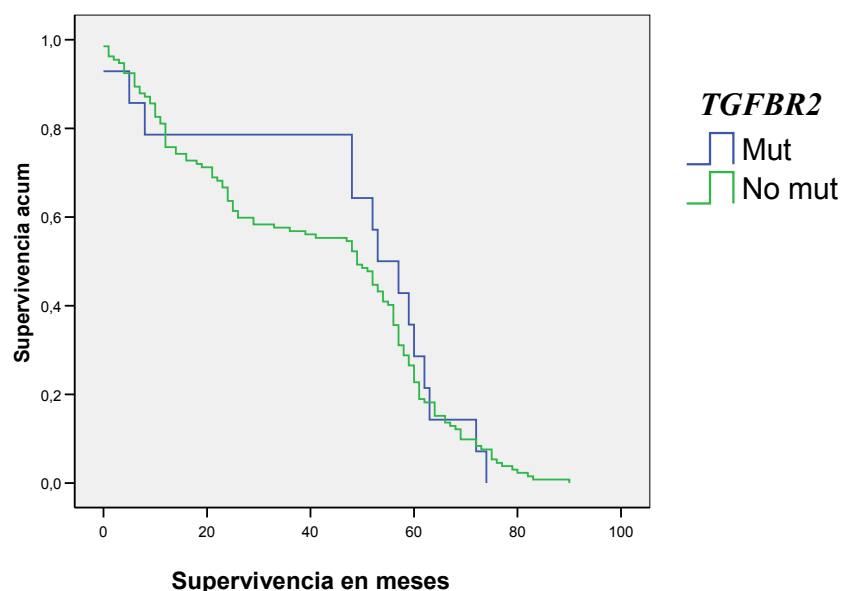
**Figura 35.** Distribución de los tumores en función del nivel de MSI y de la presencia o no de mutaciones en el gen *TGFBR2*.

## MUTACIONES EN *TGFBR2* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

Los pacientes portadores de mutaciones en *TGFBR2* presentaron una media de supervivencia más alta que los pacientes portadores del gen normal ( $47,21 \pm 24,5$  meses frente a  $40,27 \pm 24,76$  meses), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,3$ ; Tabla 14). Este resultado se vuelve a observar en la curva de supervivencia de Kaplan-Meier, aunque el resultado tampoco alcanza la significación estadística (log rank  $P = 0,77$ ; Figura 36).

Mut <i>TGFBR2</i>	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
No (141)	$40,27 \pm 24,76$	75/141 (53,2%)	30/141 (21,27%)
Si (14)	$47,21 \pm 24,50$	11/14 (78,57%)	4/14 (28,57%)

**Tabla 14.** Supervivencia de los pacientes con mutaciones en *TGFBR2*.



**Figura 36.** Curva Kaplan- Meier de supervivencia de los pacientes con mutaciones en el gen *TGFBR2*.

## MUTACIONES EN *TGFBR2* Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS EN LOS TUMORES MSI-H

Un 92,85% de los tumores portadores de mutaciones en *TGFBR2* son MSI-H (13/14) (Tabla 13 y Figura 35). Por tanto, los siguientes análisis se realizan exclusivamente en relación dentro del grupo MSI-H, ya que en el grupo MSI-L hay sólo un tumor que presenta estas alteraciones y ninguno en el grupo de los tumores MSS. La relación entre las mutaciones en el gen *TGFBR2* y las características clinicopatológicas de los tumores MSI-H se resume en la Tabla 15.

Los tumores MSI-H con mutaciones en *TGFBR2* presentan en un 76,92% (10/13) de los casos localización derecha ( $\chi^2 = 6,11$ ;  $p = 0,03$ ; Tabla 15). La mayoría (10/13: 76,9%) están en el estadio B de Dukes, frente a 2 tumores en el estadio C (2/13: 15,38%) y sólo uno en el estadio D (1/13: 7,7%;  $\chi^2 = 8,76$ ;  $p = 0,01$ ; Tabla 15). Finalmente, un 38,46% están pobremente

diferenciados y otro 38,46% moderadamente diferenciados (5/13: en cada grupo); frente al 23,08% (3/13) que están bien diferenciados ( $\chi^2 = 6,89$ ;  $p = 0,04$ ; Tabla 15). No observamos asociaciones entre las mutaciones en *TGFBR2* y las restantes variables clinicopatológicas de la Tabla 15.

Variable	Mutaciones en <i>TGFBR2</i> (MSI-H)		p
	No	Si	
<b>Sexo</b>			
Varones	3 (33,3%)	6 (66,7%)	ns
Mujeres	0 (0%)	7 (100%)	
<b>Media de edad</b>	66,7 $\pm$ 5,8 años	68,7 $\pm$ 6,1 años	ns
<b>Edad</b>			
$\leq 50$ años	1 (100%)	0 (0%)	ns
$> 50$ años	2 (13,3%)	13 (86,7%)	
<b>Localización</b>			
Derecha	0 (0%)	10 (100%)	<b>0,03</b>
Izquierda	3 (50%)	3 (50%)	
<b>Estadios de Dukes</b>			
A	0 (0%)	0 (0%)	<b>0,017</b>
B	0 (0%)	10 (100%)	
C	3 (60%)	2 (40%)	
D	0 (0%)	1 (100%)	
<b>Grado de diferenciación</b>			
Bien	3 (50%)	3 (50%)	<b>0,04</b>
Moderado	0 (0%)	5 (100%)	
Pobre	0 (0%)	5 (100%)	
<b>Recurrencia local</b>			
No	2 (13,3%)	13 (86,7%)	ns
Si	1 (100%)	0 (0%)	
<b>Persistencia (metástasis)</b>			
No	2 (18,2%)	9 (81,8%)	ns
Si	1 (20%)	4 (80%)	
<b>Invasión vascular</b>			
No	3 (21,4%)	11 (78,6%)	ns
Si	0 (0%)	2 (100%)	
<b>Fenotipo mucosecretor</b>			
No	3 (25%)	9 (75%)	ns
Si	0 (0%)	4 (100%)	
<b>Total</b>	3/16 (18,75%)	13/16 (81,25%)	

**Tabla 15.** Mutaciones de *TGFBR2* en los tumores MSI-H en relación con las características clinicopatológicas de los tumores.



## MUTACIONES EN *TGFBR2* Y CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS DE LOS TUMORES MSI-H

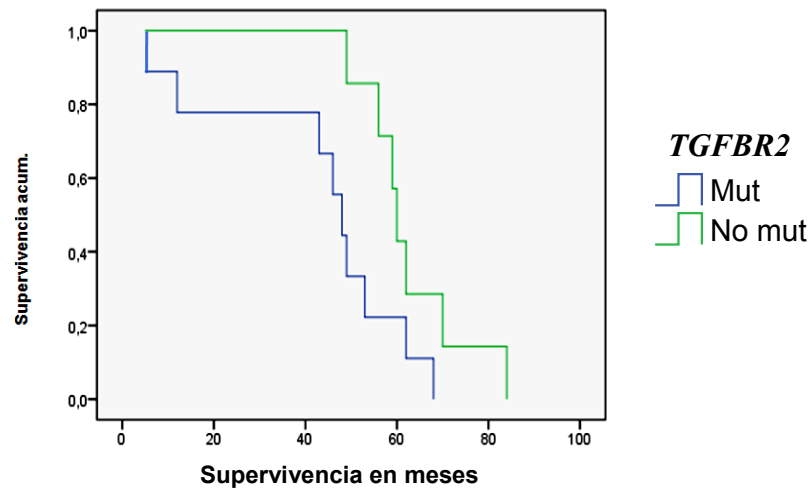
No se ha observado ninguna relación entre las mutaciones en el gen *TGFBR2* y las características genéticas dentro del grupo de tumores MSI-H (Tabla 16).

Variable	Mutaciones en <i>TGFBR2</i> (MSI-H)		p
	No	Si	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>			
No	3 (21,4%)	11 (78,6%)	ns
Si	0 (0%)	2 (100%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>			
No	2 (15,4%)	11 (84,6%)	ns
Si	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>			
No	2 (18,2%)	9 (81,8%)	ns
Si	1 (20%)	4 (80%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>			
No	3 (30%)	7 (70%)	ns
Si	0 (0%)	6 (100%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>			
No	3 (20%)	12 (80%)	ns
Si	0 (0%)	1 (100%)	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>			
No	2 (20%)	8 (80%)	ns
Si	1 (16,7%)	5 (83,3%)	
<b>Total</b>	3/16 (18,75%)	13/16 (81,25%)	

**Tabla 16.** Mutaciones de *TGFBR2* en los tumores MSI-H en relación con las características genéticas de los tumores.

## MUTACIONES EN *TGFBR2* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES EN LOS TUMORES MSI-H

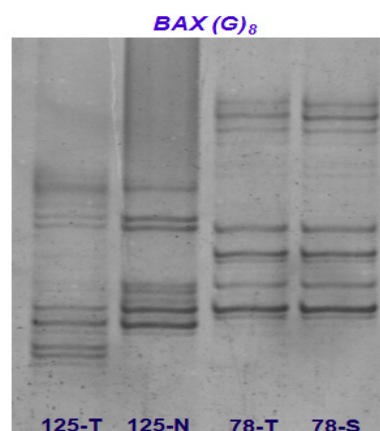
La curva de supervivencia de Kaplan-Meier para los pacientes con tumores MSI-H demuestra que los portadores de mutaciones en el gen *TGFBR2* presentan una peor supervivencia en comparación con los pacientes con el gen normal (log rank P = 0,04; Figura 37).



**Figura 37.** Curva Kaplan- Meier de supervivencia de los pacientes con tumores MSI-H y mutaciones en *TGFBR2*.

### GEN *BAX*

En este estudio hemos llevado a cabo el análisis de la región  $G_8$  situada en el exon 3 del gen *BAX* mediante PCR-SSCP en las muestras de ADN genómico pertenecientes a 155 pacientes de esta serie. Hemos detectado mutaciones en 6 individuos de los 155 analizados (3,87%), mientras que los 149 restantes (96,13%) no presentaron alteraciones de esta región.



**Figura 38.** Análisis de las mutaciones en la región  $G_8$  del gen *BAX*: Ejemplo de geles de electroforesis mostrando una mutación del gen *BAX* en la muestra del paciente 125, mientras el paciente 78 muestra un patrón normal. N, T y S: tejido normal, tumoral y sangre periférica.

### MUTACIONES EN *BAX* Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS

La Tabla 17 resume la distribución de los tumores analizados en función de las mutaciones en *BAX* y de las características clinicopatológicas.

Todos los pacientes portadores de mutaciones en el gen *BAX* son mayores de 50 años, sin embargo esta comparación no es estadísticamente significativa ( $p = 1,0$ ; Tabla 17). Tres de los 6 tumores que presentan mutaciones en *BAX* están pobremente diferenciados (50%), dos tumores son moderadamente diferenciados (33,3%) y un solo tumor está bien diferenciado (16,6%;  $\chi^2 =$

14,36;  $p = 0,002$ ; Tabla 17). No se observan más asociaciones con las demás variables clinicopatológicas (Tabla 17).

Variable	Mutaciones en <i>BAX</i>		p
	No	Si	
<b>Sexo</b>			
Varones	85 (97,7%)	2 (2,3%)	ns
Mujeres	64 (94,1%)	4 (5,9%)	
<b>Media de edad</b>	67,7 $\pm$ 1,0 años	75,0 $\pm$ 5,0 años	ns
<b>Edad</b>			
$\leq 50$ años	17 (100%)	0 (0%)	ns
$> 50$ años	132 (95,7%)	6 (4,3%)	
<b>Localización</b>			
Derecha	31 (91,2%)	3 (8,8%)	ns
Izquierda	118 (97,5%)	3 (2,5%)	
<b>Estadios de Dukes</b>			
A	11 (100%)	0 (0%)	ns
B	57 (98,3%)	1 (1,7%)	
C	55 (96,5%)	2 (3,5%)	
D	26 (89,7%)	3 (10,3%)	
A+B	68 (98,6%)	1 (1,4%)	ns
C+D	81 (94,2%)	5 (5,8%)	
<b>Grado de diferenciación</b>			
Bien	69 (98,6%)	1 (1,4%)	<b>0,002</b>
Moderado	70 (97,2%)	2 (2,8%)	
Pobre	10 (76,9%)	3 (23,1%)	
<b>Recurrencia local</b>			
No	134 (97,1%)	4 (2,9%)	ns
Si	15 (88,2%)	2 (11,8%)	
<b>Persistencia (metástasis)</b>			
No	110 (96,5%)	4 (3,5%)	ns
Si	39 (95,1%)	2 (4,9%)	
<b>Invasión vascular</b>			
No	128 (97%)	4 (3%)	ns
Si	21 (91,3%)	2 (8,7%)	
<b>Fenotipo mucosecretor</b>			
No	137 (95,8%)	6 (4,2%)	ns
Si	12 (100%)	0 (0%)	
<b>Total</b>	149/155 (96,13%)	6/155 (3,87%)	

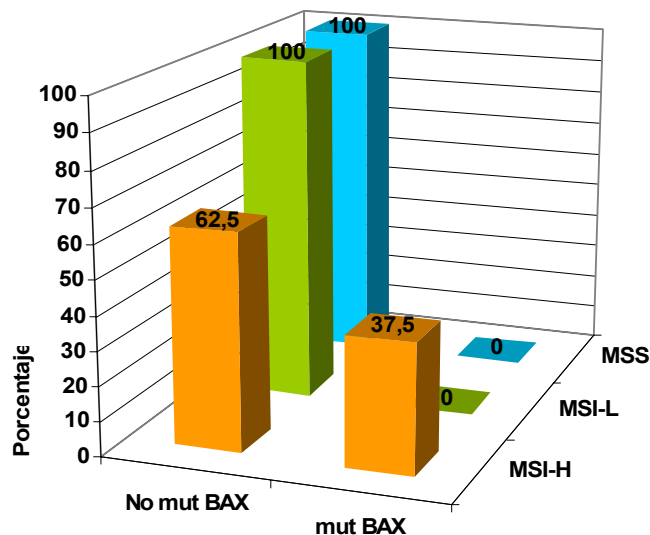
**Tabla 17.** Características clinicopatológicas de los tumores con mutaciones en *BAX*.

## MUTACIONES EN *BAX* Y CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS

Las mutaciones en el gen *BAX* aparecen asociadas a tumores inestables. Ningún tumor MSS o MSI-L presenta mutaciones en el gen *BAX*; por el contrario todos los tumores con mutaciones en el gen son MSI-H ( $\chi^2 = 10,87$ ;  $p = 0,004$ ; Tabla 18 y Figura 39).

Variable	Mutaciones en <i>BAX</i>		p
	No	Si	
<b>MSI</b>			
MSS	121 (100%)	0 (0%)	<b>0,004</b>
MSI-L	18 (100%)	0 (0%)	
MSI-H	10 (62,5%)	6 (37,5%)	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>			
No	95 (95%)	5 (5%)	ns
Si	54 (98,2%)	1 (1,8%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>			
No	108 (95,6%)	5 (4,4%)	ns
Si	41 (97,6%)	1 (2,4%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>			
No	134 (96,4%)	5 (3,6%)	ns
Si	15 (93,8%)	1 (6,2%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>			
No	117 (95,1%)	6 (4,9%)	ns
Si	32 (100%)	0 (0%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>			
No	135 (95,7%)	6 (4,3%)	ns
Si	14 (100%)	0 (0%)	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>			
No	132 (96,3%)	5 (3,7%)	ns
Si	17 (94,4%)	1 (5,6%)	
<b>Total</b>	149/155 (96,13%)	6/155 (3,87%)	

**Tabla 18.** Características genéticas de los tumores con mutaciones en *BAX*.



**Figura 39.** Distribución de los tumores en función del nivel de MSI y de la presencia o no de mutaciones en el gen *BAX*.

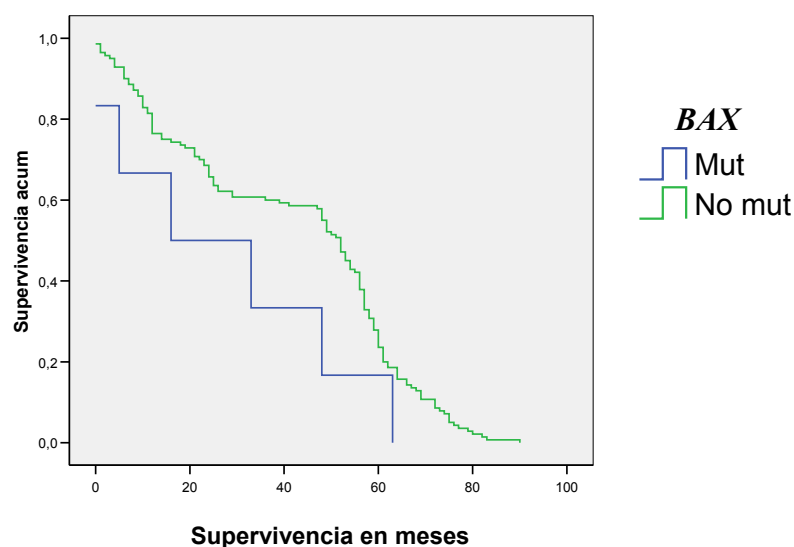
## MUTACIONES EN *BAX* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

Los individuos portadores del gen *BAX* alterado presentan una media de supervivencia más baja que los individuos portadores del gen sano ( $27,5 \pm 10,1$  meses frente a  $41,7 \pm 2,1$  meses), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,1$ ). Las tasas de supervivencia a los 3 y 5 años muestran igualmente un descenso en el grupo de los portadores de *BAX* mutado en comparación con los individuos sin esta alteración (Tabla 19).

Mut <i>BAX</i>	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
No (149)	$41,7 \pm 2,1$	84/149 (56,37%)	33/149 (22,14%)
Si (6)	$27,5 \pm 10,17$	2/6 (33,33%)	0/6 (0%)

**Tabla 19.** Supervivencia de los pacientes con mutaciones en *BAX*.

La curva de supervivencia de Kaplan-Meier demuestra que los pacientes que no muestran mutaciones en el gen *BAX* presentan una ventaja en la supervivencia frente a los pacientes portadores de tal alteración, aunque esta diferencia no alcanza una significación estadística (log rank  $P = 0,1$ ; Figura 40).



**Figura 40.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes con mutaciones en el gen *BAX*.

## MUTACIONES EN *BAX* Y CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS EN LOS TUMORES MSI-H

Puesto que todos los tumores portadores de mutaciones en el gen *BAX* son MSI-H, los siguientes análisis se realizan exclusivamente en este grupo. La Tabla 20 resume la relación entre las mutaciones en el gen *BAX* y las características clinicopatológicas de los tumores MSI-H.

Variable	Mutaciones en <i>BAX</i> (MSI-H)		p
	No	Si	
<b>Sexo</b>			
Varones	5 (55,6%)	4 (44,4%)	ns
Mujeres	5 (71,4%)	2 (28,6%)	
<b>Media de edad</b>	73,3 ± 10,0 años	66,6 ± 4,7 años	ns
<b>Edad</b>			
≤50 años	5 (100%)	0 (0%)	ns
>50 años	5 (45,5%)	6 (54,5%)	
<b>Localización</b>			
Derecha	4 (40%)	6 (60%)	<b>0,02</b>
Izquierda	6 (100%)	0 (0%)	
<b>Estadios de Dukes</b>			
A	0 (0%)	0 (0%)	<b>0,013</b>
B	9 (90%)	1 (10%)	
C	1 (20%)	4 (80%)	
D	0 (0%)	1 (100%)	
<b>Grado de diferenciación</b>			
Bien	6 (100%)	0 (0%)	<b>0,001</b>
Moderado	4 (80%)	1 (20%)	
Pobre	0 (0%)	5 (100%)	
<b>Recurrencia local</b>			
No	9 (60%)	6 (40%)	ns
Si	1 (100%)	0 (0%)	
<b>Persistencia (metástasis)</b>			
No	8 (72,7%)	3 (27,3%)	ns
Si	2 (40%)	3 (60%)	
<b>Invasión vascular</b>			
No	9 (69,2%)	4 (30,8%)	ns
Si	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
<b>Fenotipo mucosecretor</b>			
No	7 (53,85%)	6 (46,15%)	ns
Si	3 (100%)	0 (0%)	
<b>Total</b>	10/16 (62,5%)	6/16 (37,5%)	

**Tabla 20.** Mutaciones de *BAX* en los tumores MSI-H en relación con las características clinicopatológicas de los tumores.

La media de edad de los pacientes MSI-H portadores del gen *BAX* mutado es de  $66,6 \pm 4,7$  años, frente a  $73,3 \pm 10$  años de edad de los pacientes MSI-H sin esta alteración. A pesar de esta diferencia, la comparación no es estadísticamente significativa ( $p = 0,5$ ). Al dividir el grupo en mayores y menores de 50 años, observamos que esta comparación tampoco es significativa ( $p = 1,0$ ), a pesar de que todos los pacientes con tumores MSI-H y portadores de mutaciones en el gen *BAX* son mayores de 50 años (Tabla 20).

Los 6 tumores MSI-H con el gen *BAX* mutado (100%) presentan una localización proximal ( $\chi^2 = 7,87$ ;  $p = 0,02$ ; Tabla 20). Un 66,7% (4/6) de los tumores MSI-H con el gen *BAX*

alterado están en un estadio avanzado de desarrollo: estadio C de Dukes, mientras que existe sólo un tumor en el estadio B y D de Dukes respectivamente ( $\chi^2 = 9,83$ ;  $p = 0,01$ ; Tabla 20). En los tumores MSI-H las mutaciones en el gen *BAX* se asocian a tumores pobremente diferenciados (5/6: 83,3%), frente a un solo tumor moderadamente diferenciado (1/6:16,7%;  $\chi^2 = 42,82$ ;  $p = 0,001$ ; Tabla 20).

#### MUTACIONES EN *BAX* Y CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS EN LOS TUMORES MSI-H

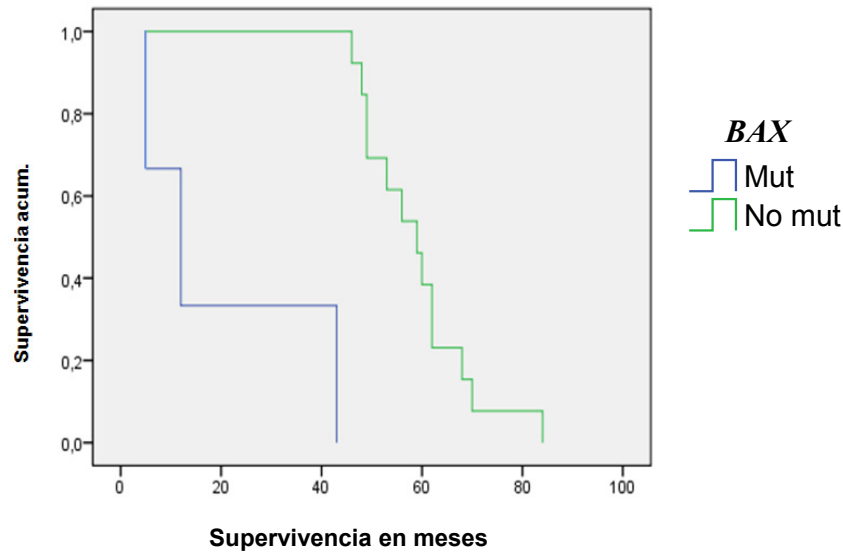
Variable	Mutaciones en <i>BAX</i> (MSI-H)		p
	No	Si	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>			
No	8 (57,1%)	6 (42,9%)	ns
Si	2 (100%)	0 (0%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>			
No	9 (69,2%)	4 (30,8%)	ns
Si	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>			
No	7 (63,6%)	4 (36,4%)	ns
Si	3 (60%)	2 (40%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>			
No	5 (50%)	5 (50%)	ns
Si	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>			
No	9 (60%)	6 (40%)	ns
Si	1 (100%)	0 (0%)	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>			
No	7 (70%)	3 (30%)	ns
Si	3 (50%)	3 (50%)	
<b>Total</b>	10/16 (62,5%)	6/16 (37,5%)	

**Tabla 21.** Características genéticas de los tumores MSI-H con mutaciones en *BAX*.

No observamos ninguna relación entre las mutaciones en el gen *BAX* y las características genéticas en el grupo de los tumores MSI-H (Tabla 21).

#### MUTACIONES EN *BAX* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES EN LOS TUMORES MSI-H

Los pacientes con tumores MSI-H y portadores de mutaciones en el gen *BAX* presentan una peor supervivencia en comparación con los pacientes portadores del gen normal (log rank  $P < 0,001$ ; Figura 41).



**Figura 41.** Curva Kaplan-Meier de supervivencia de los pacientes con tumores MSI-H y mutaciones en *BAX*.

#### ANÁLISIS CONJUNTO DE *BAX* Y *TGFBR2*

Sólo 3 de los 155 tumores analizados presentan mutaciones en *BAX* y *TGFBR2* simultáneamente, por lo que es imposible realizar un estudio estadístico para poder determinar las asociaciones que pueden presentar estos tumores con las variables genéticas, clinicopatológicas o con la supervivencia de los pacientes. Sin embargo, hemos observado que estos tumores presentan una serie de características comunes:

En primer lugar, los 3 tumores presentan una alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H), una localización derecha y son pobremente diferenciados. Además los 3 pertenecen a pacientes mayores de 60 años de edad. Por otra parte, los 16 tumores MSI-H presentan al menos uno de los 2 genes mutado, al contrario de los tumores MSS y MSI-L (Tabla 22).

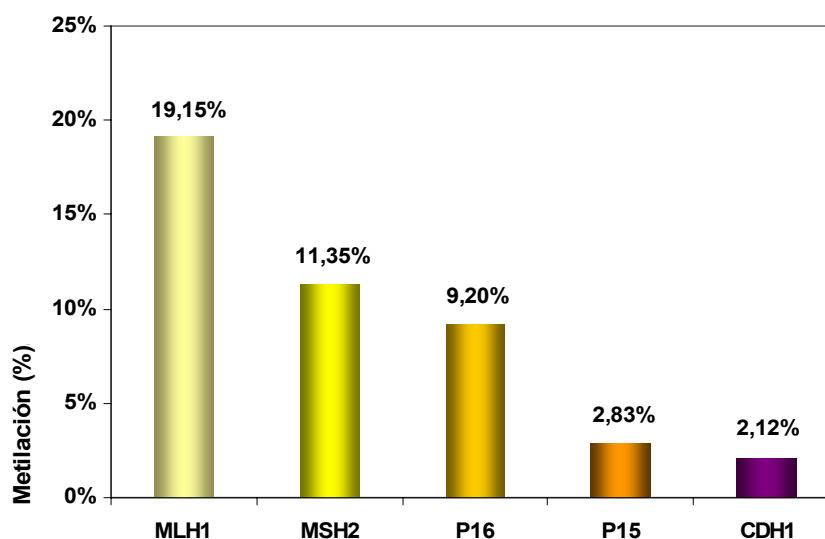
MSI	No mut	Mut <i>TGFBR2</i>	Mut <i>BAX</i>	Mut en <i>BAX</i> o <i>TGFBR2</i>	Mut en <i>BAX</i> y <i>TGFBR2</i>	Total
MSS	121 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	121
MSI-L	17 (94,4%)	1 (5,6%)	0 (0%)	1 (5,6%)	0 (0%)	18
MSI-H	0 (0%)	13 (81,2%)	6 (37,5%)	16 (100%)	3 (18,75%)	16

**Tabla 22.** Mutaciones en *TGFBR2* y/o en *BAX*, en los tumores con diferente nivel de MSI.

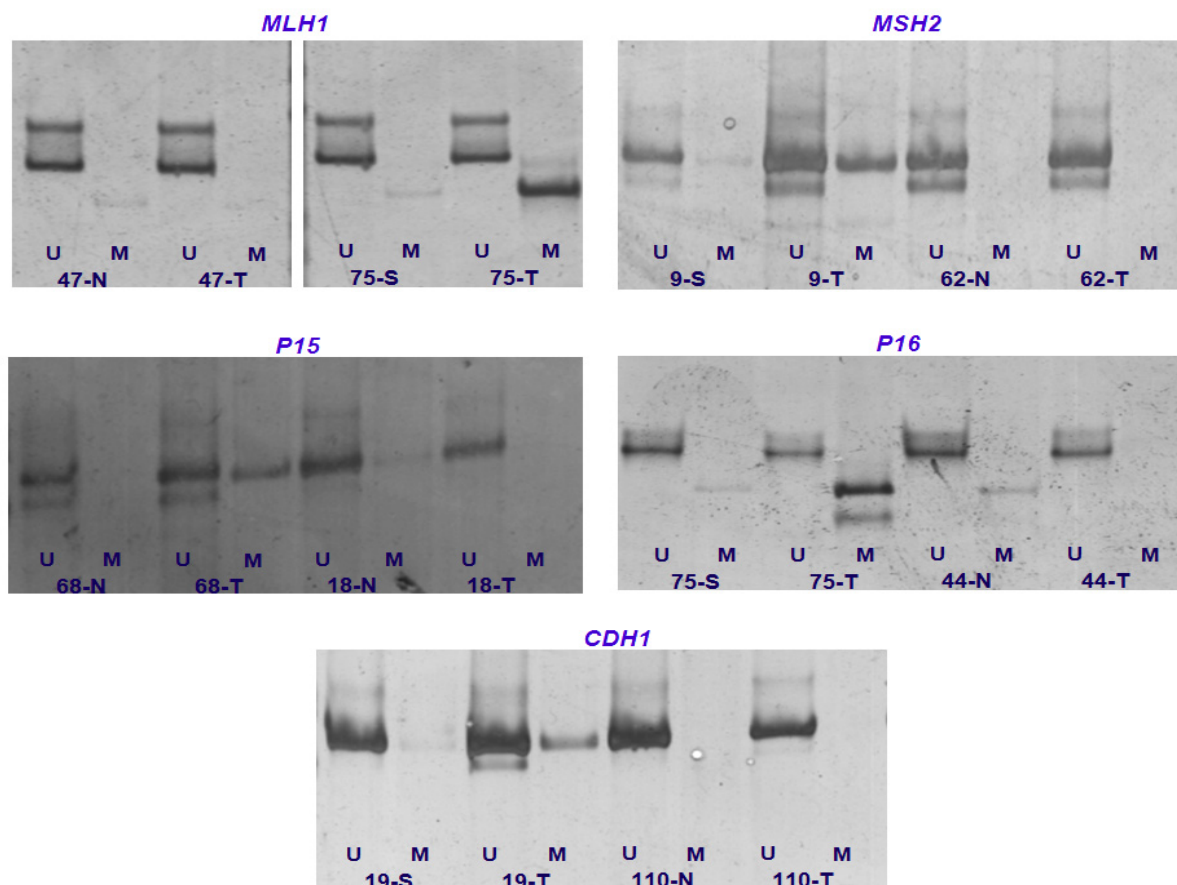


### 3. ANÁLISIS DE LA METILACIÓN

La determinación del estado de metilación de las regiones promotoras de los genes *MLH1*, *MSH2*, *P15*, *P16* y *CDH1* se realizó mediante MSP (PCR específica de metilación) en las muestras de ADN genómico, procedente de 141 tumores colorrectales esporádicos de esta serie. Los resultados obtenidos demuestran unas frecuencias de hipermetilación que varían considerablemente entre los 5 promotores analizados, siendo *MLH1* el gen que presenta la frecuencia más alta: 19,15% (27/141), seguido por el gen *MSH2*: 11,35% (16/141) y el gen *P16*: 9,2% (13/141). El gen *P15* presenta una frecuencia de metilación más baja que la de *P16*: 2,83% (4/141); y por último el gen *CDH1* con la frecuencia más baja: 2,12%, puesto que solamente 3 individuos de los 141 analizados presentan metilación en el promotor de este gen (Figura 42).



**Figura 42.** Comparación entre las frecuencias de metilación de los 5 promotores analizados.



**Figura 43. Análisis de la metilación del promotor de los genes *MLH1*, *MSH2*, *P15*, *P16* y *CDH1* mediante MSP:** Ejemplos de geles de electroforesis mostrando metilación del promotor de *MLH1* en el paciente 75, de *MSH2* en el paciente 9; de *P15* en el paciente 68; de *P16* en el paciente 75 y de *CDH1* en el paciente 19; mientras que los pacientes 47, 62, 18, 44 y 110 muestran un patrón de metilación normal en el promotor de cada uno de estos genes, respectivamente. U y M corresponden a los cebadores no-metilado y metilado utilizados en la MSP. N, T y S: tejido normal, tumoral y sangre periférica.

### Gen *MLH1*

#### METILACIÓN DE *MLH1* Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS

La media de edad de los pacientes con el gen *MLH1* metilado es de  $69,7 \pm 14,0$  años (con un rango de 48-93 años). Mientras que los pacientes que no tienen esta alteración presentan una media de edad de  $66,62 \pm 12,4$  años (y un rango de 16-90 años), sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,2$ ). Por otra parte, un 19,2% de los pacientes con el gen *MLH1* metilado son mayores de 50 años, frente al 18,8% que son menores de 50 años. Esta comparación tampoco es estadísticamente significativa ( $p = 1,0$ ; Tabla 23). Un 33,3% (10/30) de los tumores portadores del gen *MLH1* metilado están localizados en el colon proximal, mientras que el 15,3% (17/111) están localizados en el colon distal ( $\chi^2 = 4,95$ ;  $p = 0,03$ ; Tabla 23). No observamos otras asociaciones entre la metilación del gen *MLH1* y las restantes variables clinicopatológicas (Tabla 23).

Variable	Metilación <i>MLH1</i>		p
	No	Si	
<b>Sexo</b>			
Varones	67 (82,7%)	14 (17,3%)	ns
Mujeres	47 (78,3%)	13 (21,7%)	
<b>Media de edad</b>	66,6 ± 12,4 años	69,7 ± 14,0 años	ns
<b>Edad</b>			
≤50 años	13 (81,3%)	3 (18,8%)	ns
>50 años	101 (80,8%)	24 (19,2%)	
<b>Localización</b>			
Derecha	20 (66,7%)	10 (33,3%)	<b>0,03</b>
Izquierda	94 (84,7%)	17 (15,3%)	
<b>Estadios de Dukes</b>			
A	9 (90%)	1 (10%)	ns
B	42 (77,8%)	12 (22,2%)	
C	41 (77,4%)	12 (22,6%)	
D	22 (91,7%)	2 (8,3%)	
A+B	51 (79,69%)	13 (20,3%)	ns
C+D	63 (81,8%)	14 (18,2%)	
<b>Grado de diferenciación</b>			
Bien	50 (80,6%)	12 (19,4%)	ns
Moderado	55 (83,3%)	11 (16,7%)	
Pobre	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
<b>Recurrencia local</b>			
No	81 (78,6%)	22 (21,4%)	ns
Si	9 (75%)	3 (25%)	
<b>Persistencia (metástasis)</b>			
No	74 (81,3%)	17 (18,7%)	ns
Si	24 (72,7%)	9 (27,3%)	
<b>Invasión vascular</b>			
No	90 (78,9%)	24 (21,1%)	ns
Si	18 (90%)	2 (10%)	
<b>Fenotipo mucosecretor</b>			
No	96 (79,3%)	25 (20,7%)	ns
Si	10 (90,9%)	1 (9,1%)	
<b>Total</b>	114/141 (80,85%)	27/141 (19,15%)	

En algunos casos no observamos un total de 114 o 27 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 23.** Características clinicopatológicas de los tumores con metilación en el gen *MLH1*.

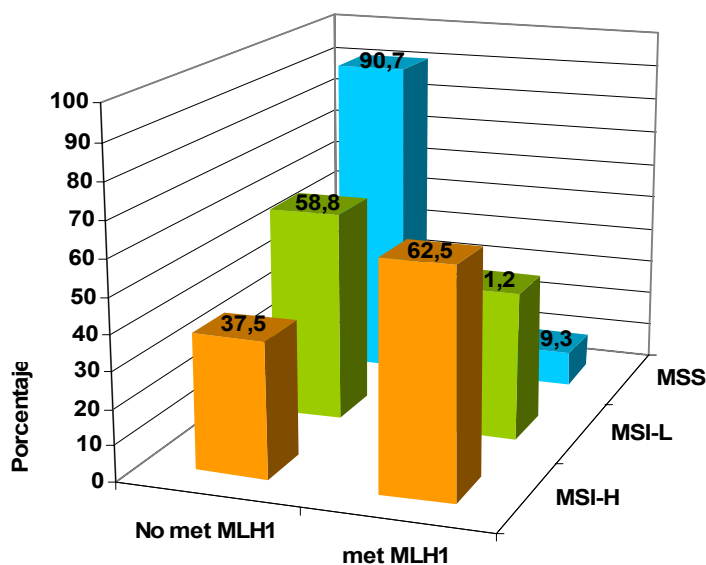
## METILACIÓN DE *MLH1* Y VARIABLES GENÉTICAS

La Tabla 24 resume las características genéticas de los tumores en relación con la metilación del promotor de *MLH1*.

Variable	Metilación <i>MLH1</i>		p
	No	Si	
<b>MSI</b>			
MSS	98 (90,7%)	10 (9,3%)	<0,001
MSI-L	10 (58,8%)	7 (41,2%)	
MSI-H	6 (37,5%)	10 (62,5%)	
<b>MSI</b>			
MSS+MSI-L	108 (86,4%)	17 (13,6%)	<0,001
MSI-H	6 (37,5%)	10 (62,5%)	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>			
No	39 (79,6%)	10 (20,4%)	ns
Si	19 (73,1%)	7 (26,9%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>			
No	80 (80%)	20 (20%)	ns
Si	25 (78,1%)	7 (21,9%)	
<b>Mut <i>BAX</i></b>			
No	111 (82,2%)	24 (17,8%)	0,08
Si	3 (50%)	3 (50%)	
<b>Mut <i>TGFBR2</i></b>			
No	106 (83,5%)	21 (16,5%)	0,02
Si	8 (57,1%)	6 (42,9%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>			
No	100 (82%)	22 (18%)	ns
Si	13 (81,3%)	3 (18,8%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>			
No	80 (78,4%)	22 (21,6%)	ns
Si	25 (86,2%)	4 (13,8%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>			
No	53 (75,7%)	17 (24,3%)	ns
Si	6 (85,7%)	1 (14,3%)	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>			
No	98 (82,4%)	21 (17,6%)	ns
Si	12 (70,6%)	5 (29,4%)	
<b>Total</b>	114/141 (80,85%)	27/141 (19,15%)	

En algunos casos no observamos un total de 114 o 27 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 24.** Características genéticas de los tumores con metilación en el gen *MLH1*.



**Figura 44.** Distribución de los tumores en función del nivel de MSI y de la metilación de *MLH1*.

La distribución de los 141 tumores colorrectales analizados en este estudio según el nivel de MSI es la siguiente: 76,61% MSS (108 tumores); 12,05% MSI-L (17 tumores) y 11,34% MSI-H (16 tumores). La metilación del promotor del gen *MLH1* está estrechamente asociada con la alta inestabilidad de microsatélites. Así, un 62,5% (10/16) de los tumores MSI-H presenta esta alteración, seguido por el grupo de tumores MSI-L (41,2%: 7/17) y finalmente el grupo de los tumores estables MSS con una tasa de metilación de sólo el 9,3% (10/108;  $\chi^2 = 31,57$ ;  $p < 0,001$ ). Por otra parte, los tumores MSI-H mantienen una alta frecuencia de metilación (62,5%) frente a la observada cuando analizamos conjuntamente los tumores MSS+MSI-L (13,6%) ( $\chi^2 = 21,9$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 24 y Figura 44). Aunque existe la misma distribución de tumores portadores del gen *BAX* mutado entre los 2 grupos de *MLH1* metilado y no metilado, la frecuencia de tumores con *MLH1* metilado y portadores de mutaciones en *BAX* (11,1%: 3/27) es mayor que la observada en el caso de los tumores sin metilación en *MLH1* (2,6%: 3/114), aunque esta comparación no es estadísticamente significativa ( $p = 0,08$ ; Tabla 24). Los tumores con *MLH1* metilado presentan una incidencia alta de mutaciones en el gen *TGFBR2* (22,2%: 6/27) en comparación con los tumores que no presentan metilación en *MLH1* (7%: 8/114) ( $\chi^2 = 5,64$ ;  $p = 0,02$ ; Tabla 24). Existe una relación inversa entre la metilación de *MLH1* y la LOH en este mismo gen, ya que el 94,4% (17/18) de los tumores portadores del gen *MLH1* metilado no presentan LOH, aunque esta comparación no es estadísticamente significativa ( $p = 1,0$ ; Tabla 24).

## METILACIÓN DE *MLH1* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

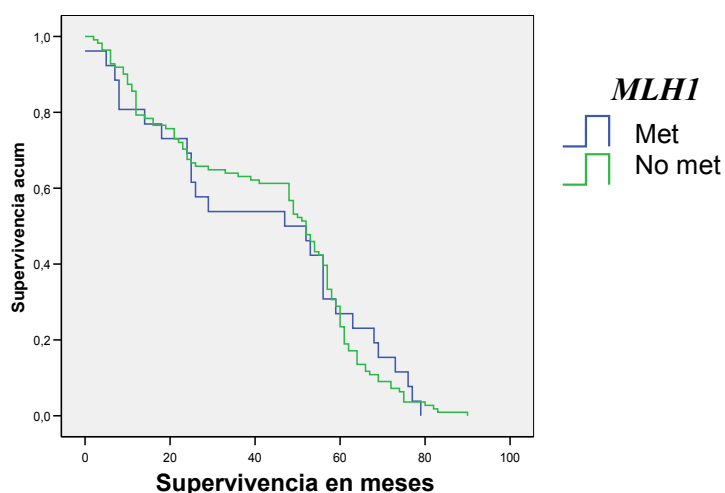
Los pacientes con *MLH1* metilado presentan una media de supervivencia ligeramente menor que los pacientes que no presentan esta alteración ( $41,2 \pm 5,1$  meses frente a  $43,1 \pm 2,2$  meses), por lo que no se aprecia una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,6$ ). La

supervivencia a los 3 años es ligeramente más baja en el grupo de pacientes con *MLH1* metilado, mientras que a los 5 años observamos una relación inversa (Tabla 25).

Met <i>MLH1</i>	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
No (114)	43,1 ± 2,2	70/114 (61,4%)	26/114 (22,8%)
Si (27)	41,2 ± 5,1	14/27 (51,85%)	7/27 (25,92%)

**Tabla 25.** Supervivencia media de los pacientes con el gen *MLH1* metilado.

En la curva de supervivencia de Kaplan-Meier volvemos a apreciar la ligera ventaja en la supervivencia que presentan los pacientes portadores del gen *MLH1* normal, aunque esta comparación tampoco alcanza una significación estadística (log rank  $P = 0,8$ ; Figura 45).



**Figura 45.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes en función de la metilación del promotor de *MLH1*.

## METILACIÓN DE *MLH1* Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS EN FUNCIÓN DEL NIVEL MSI

La distribución de los tumores en función de la metilación del gen *MLH1*, las características clinicopatológicas y el nivel MSI se resume en la Tabla 26.

Variable		MSI	Metilación <i>MLH1</i>		p
			No	Si	
Sexo	Varones	MSS	57 (89,1%)	7 (10,9%)	<0,001
		MSI-L	7 (87,5%)	1 (12,5%)	
		MSI-H	3 (33,3%)	6 (66,7%)	
	Mujeres	MSS	41 (93,2%)	3 (6,8%)	<0,001
		MSI-L	3 (33,3%)	6 (66,7%)	
		MSI-H	3 (42,9%)	4 (57,1%)	
Media de edad		MSS	67,24 ± 11,2	68,6 ± 14,8	ns
		MSI-L	66,4 ± 19,1	64,57 ± 13,2	ns
		MSI-H	56,8 ± 16,3	74,5 ± 13,5	0,03
Edad	≤50 años	MSS	10 (90,9%)	1 (9,1%)	ns
		MSI-L	1 (50%)	1 (50%)	
		MSI-H	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
	>50 años	MSS	88 (90,7%)	9 (9,3%)	<0,001
		MSI-L	9 (60%)	6 (40%)	
		MSI-H	4 (30,8%)	9 (69,2%)	
Localización	Derecha	MSS	13 (92,9%)	1 (7,1%)	<0,001
		MSI-L	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
		MSI-H	2 (20%)	8 (80%)	
	Izquierda	MSS	85 (90,4%)	9 (9,6%)	<0,001
		MSI-L	5 (45,5%)	6 (54,5%)	
		MSI-H	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
Estadios de Dukes	A	MSS	9 (90%)	1 (10%)	--
		MSI-L	--	--	
		MSI-H	--	--	
	B	MSS	33 (94,3%)	2 (5,7%)	<0,001
		MSI-L	5 (55,6%)	4 (44,4%)	
		MSI-H	4 (40%)	6 (60%)	
	C	MSS	38 (84,4%)	7 (15,6%)	0,01
		MSI-L	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
		MSI-H	2 (40%)	3 (60%)	
	D	MSS	18 (100%)	0 (0%)	0,001
		MSI-L	4 (80%)	1 (20%)	
		MSI-H	0 (0%)	1 (100%)	
	A+B	MSS	43 (93,5%)	3 (6,5%)	<0,001
		MSI-L	5 (55,6%)	4 (44,4%)	
		MSI-H	4 (40%)	6 (60%)	
	C+D	MSS	55 (88,7%)	7 (11,3%)	0,001
		MSI-L	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
		MSI-H	2 (33,3%)	4 (66,7%)	
Total			27/141(19,15%)	114/141(80,85%)	

En algunos casos no observamos un total de 114 o 27 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 26.** Características clinicopatológicas de los tumores con metilación en *MLH1* según el nivel MSI.

Variable	MSI	Metilación <i>MLH1</i>		p		
		No	Si			
Grado de diferenciación						
	Bien	MSS	41 (85,4%)	7 (14,6%)	ns	
		MSI-L	6 (75%)	2 (25%)		
		MSI-H	3 (50%)	3 (50%)		
	Moderado	MSS	50 (94,3%)	3 (5,7%)	<0,001	
		MSI-L	4 (50%)	4 (50%)		
		MSI-H	1 (20%)	4 (80%)		
	Pobre	MSS	7 (100%)	0 (0%)	0,02	
		MSI-L	0 (0%)	1 (100%)		
		MSI-H	2 (40%)	3 (60%)		
Recurrencia local						
	No	MSS	70 (89,7%)	8 (10,3%)	<0,001	
		MSI-L	7 (53,8%)	6 (46,2%)		
		MSI-H	4 (33,3%)	8 (66,7%)		
	Si	MSS	9 (81,8%)	2 (18,2%)	ns	
		MSI-L	--	--		
		MSI-H	0 (0%)	1 (100%)		
	Persistencia (metástasis)					
		No	MSS	63 (88,7%)	8 (11,3%)	0,002
			MSI-L	6 (60%)	4 (40%)	
MSI-H			5 (50%)	5 (50%)		
Si		MSS	20 (90,9%)	2 (9,1%)	0,001	
		MSI-L	4 (57,1%)	3 (42,9%)		
		MSI-H	0 (0%)	4 (100%)		
Invasión vascular						
		No	MSS	79 (88,8%)	10 (11,2%)	<0,001
			MSI-L	7 (53,8%)	6 (46,2%)	
	MSI-H		4 (33,3%)	8 (66,7%)		
	Si	MSS	16 (100%)	0 (0%)	0,002	
		MSI-L	1 (100%)	0 (0%)		
		MSI-H	1 (33,3%)	2 (66,7%)		
	Fenotipo mucosecretor					
		No	MSS	88 (89,8%)	10 (10,2%)	<0,001
			MSI-L	5 (45,5%)	6 (54,5%)	
MSI-H			3 (25%)	9 (75%)		
Si		MSS	6 (100%)	0 (0%)	ns	
		MSI-L	2 (100%)	0 (0%)		
		MSI-H	2 (66,7%)	1 (33,3%)		
Total		114/141 (80,85%)	27/141(19,15%)			

En algunos casos no observamos un total de 114 o 27 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 26 (Cont).**

En varones observamos que la mayoría de los tumores con *MLH1* metilado son MSI-H (66,7%;  $\chi^2 = 17,28$ ;  $p < 0,001$ ). En las mujeres, la mayoría de los tumores con el gen *MLH1* metilado son MSI-L y MSI-H (66,7% y 57,1%;  $\chi^2 = 21,64$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 26).

No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de edad de los pacientes con metilación en *MLH1* en los grupos MSS y MSI-L. En los MSI-H, sin embargo, observamos que la media de edad de los pacientes portadores del gen *MLH1* metilado es mayor



que la de los pacientes sin esta alteración ( $74,5 \pm 13,5$  años frente a  $56,8 \pm 16,3$  años de edad;  $p = 0,03$ ; Tabla 26). Por otra parte, la mayoría de los tumores MSI-H de pacientes mayores de 50 años presentan metilación en el gen *MLHI* (69,2%: 9/13;  $\chi^2 = 31,31$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 26). La mayoría de los tumores metilados en *MLHI*, con localización en el colon izquierdo son MSS (52,9%: 9/17) y MSI-L (35,3%: 6/17;  $\chi^2 = 16,94$ ;  $p < 0,001$ ), mientras que los que tienen localización derecha son en su mayoría MSI-H (80%: 8/10;  $\chi^2 = 14,87$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 26).

Además, estos tumores son de estadio B y C de Dukes. Los tumores MSI-L se encuentran en su mayoría en el estadio de Dukes C y B y los MSS en el estadio C ( $\chi^2 = 16,34$ ;  $p < 0,001$  para el estadio B;  $\chi^2 = 8,59$ ;  $p = 0,01$  para el estadio C, y  $\chi^2 = 13,52$ ;  $p = 0,001$  para el estadio D). Cuando comparamos los estadios A+B con C+D, observamos que la mayoría de los tumores MSI-L con el gen *MLHI* metilado están en estadios tempranos A+B; existe casi la misma proporción de tumores MSI-H con metilación en *MLHI* entre los estadios temprano A+B y tardío C+D, mientras que los tumores MSS están en estadios más avanzados C+D ( $\chi^2 = 18,58$ ;  $p < 0,001$  para los estadios A+B, y  $\chi^2 = 13,32$ ;  $p = 0,001$  para los estadios C+D; Tabla 26).

Los tumores MSI-H y MSI-L con el gen *MLHI* metilado son en su mayoría moderadamente diferenciados, mientras que los tumores MSS son bien diferenciados ( $p = 0,1$ ;  $\chi^2 = 25,46$ ;  $p < 0,001$  y  $\chi^2 = 7,36$ ;  $p = 0,02$  para los estadios de diferenciación bien, moderada y pobre respectivamente; Tabla 26). La mayoría de los tumores MSS con el gen *MLHI* metilado no presentan metástasis. Por otra parte, observamos que todos los tumores MSI-H con metástasis presentan metilación en el gen *MLHI* ( $\chi^2 = 12,01$ ;  $p = 0,002$  y  $\chi^2 = 15,19$ ;  $p = 0,001$  respectivamente; Tabla 26). Los tumores con metilación no muestran recurrencia local, ni invasión vascular, ni fenotipo mucosecretor, independientemente de su nivel MSI ( $\chi^2 = 25,14$ ;  $p < 0,001$ ;  $\chi^2 = 25,11$ ;  $p < 0,001$  y  $\chi^2 = 35,85$ ;  $p < 0,001$  respectivamente; Tabla 26).

## **METILACIÓN DE *MLHI* Y VARIABLES GENÉTICAS EN FUNCIÓN DEL NIVEL MSI**

La distribución de los tumores en función de la metilación del gen *MLHI*, las características genéticas y el nivel MSI se resume en la Tabla 27.

Variable		MSI	Metilación <i>MLH1</i>		p
			No	Si	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>					
	No	MSS	32 (88,9%)	4 (11,1%)	<b>0,006</b>
		MSI-L	5 (71,4%)	2 (28,6%)	
		MSI-H	2 (33,3%)	4 (66,7%)	
	Si	MSS	16 (80%)	4 (20%)	ns
		MSI-L	2 (40%)	3 (60%)	
		MSI-H	1 (100%)	0 (0%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>					
	No	MSS	68 (90,7%)	7 (9,3%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	7 (58,3%)	5 (41,7%)	
		MSI-H	5 (38,5%)	8 (61,5%)	
	Si	MSS	21 (87,5%)	3 (12,5%)	<b>0,05</b>
		MSI-L	3 (60%)	2 (40%)	
		MSI-H	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
<b>Mut <i>BAX</i></b>					
	No	MSS	95 (90,5%)	10 (9,5%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	10 (58,8%)	7 (41,2%)	
		MSI-H	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
	Si	MSS	3 (100%)	0 (0%)	ns
		MSI-L	--	--	
		MSI-H	0 (0%)	3 (100%)	
<b>Mut <i>TGFBR2</i></b>					
	No	MSS	94 (90,4%)	10 (9,6%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	9 (56,3%)	7 (43,8%)	
		MSI-H	3 (42,9%)	4 (57,1%)	
	Si	MSS	4 (100%)	0 (0%)	<b>0,05</b>
		MSI-L	1 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	3 (33,3%)	6 (66,7%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>					
	No	MSS	89 (91,8%)	8 (8,2%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	8 (53,3%)	7 (46,7%)	
		MSI-H	3 (30%)	7 (70%)	
	Si	MSS	8 (88,9%)	1 (11,1%)	ns
		MSI-L	2 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	3 (60%)	2 (40%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>					
	No	MSS	70 (88,6%)	9 (11,4%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	7 (53,8%)	6 (46,2%)	
		MSI-H	3 (30%)	7 (70%)	
	Si	MSS	19 (95%)	1 (5%)	ns
		MSI-L	3 (75%)	1 (25%)	
		MSI-H	3 (60%)	2 (40%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>					
	No	MSS	44 (86,3%)	7 (13,7%)	<b>0,002</b>
		MSI-L	6 (54,5%)	5 (45,5%)	
		MSI-H	3 (37,5%)	5 (62,5%)	
	Si	MSS	5 (83,3%)	1 (16,7%)	ns
		MSI-L	1 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	--	--	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>					
	No	MSS	87 (90,6%)	9 (9,4%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
		MSI-H	3 (30%)	7 (70%)	
	Si	MSS	8 (100%)	0 (0%)	<b>0,03</b>
		MSI-L	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
		MSI-H	3 (50%)	3 (50%)	
<b>Total</b>			114/141 (80,85%)	27/141 (19,15%)	

En algunos casos no observamos un total de 114 o 27 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 27.** Características genéticas de los tumores con metilación en el gen *MLH1* en función del nivel MSI.

Existe una relación inversa entre la presencia de metilación en *MLHI* y las mutaciones del gen *KRAS2* en los tumores MSI-H, sin embargo, esta relación no existe en los tumores MSS y MSI-L ( $\chi^2 = 10,10$ ;  $p = 0,006$ ; Tabla 27). Independientemente de la presencia de LOH en *TP53*, los tumores MSI-L y MSI-H presentan metilación en *MLHI* ( $\chi^2 = 22,87$ ;  $p < 0,001$  en los tumores sin LOH en *TP53* y  $\chi^2 = 5,81$ ;  $p = 0,05$  en los tumores con LOH en *TP53*). Existe igualmente una relación inversa entre la metilación de *MLHI* y la LOH del mismo gen ( $\chi^2 = 12,12$ ;  $p = 0,002$ ; Tabla 27). La mayoría de los tumores MSI-H con el gen *MLHI* metilado presentan mutaciones en el gen *TGFBR2* ( $\chi^2 = 5,83$ ;  $p = 0,05$ ), al contrario de los tumores MSS y MSI-L ( $\chi^2 = 20,55$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 27), y en *BAX*, aunque esta última no es estadísticamente significativa, al contrario de los tumores MSS y MSI-L ( $p = 0,1$  y  $\chi^2 = 22,83$ ;  $p < 0,001$  respectivamente; Tabla 27). Los tumores con el gen *MLHI* metilado no presentan LOH en *APC*, ni en *DCC*, ni en *MSH2* ( $\chi^2 = 32,87$ ;  $p < 0,001$  y  $\chi^2 = 23,34$ ;  $p < 0,001$ ;  $\chi^2 = 27,25$ ;  $p < 0,001$  respectivamente; Tabla 27).

## METILACIÓN DE *MLHI* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE MSI

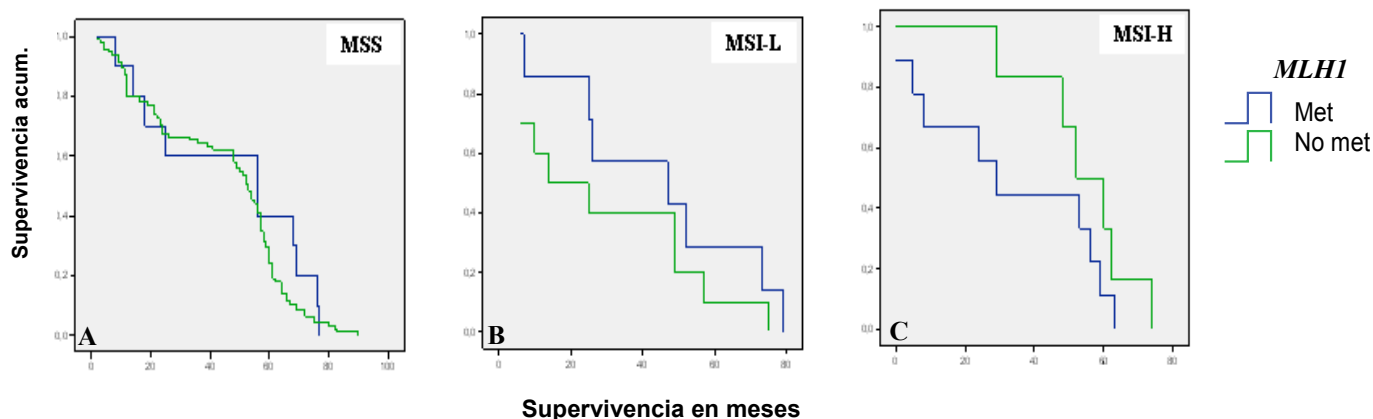
No se observan diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de los pacientes con tumores MSS y MSI-L y metilación en *MLHI* ( $p = 0,7$  y  $p = 0,2$  respectivamente). Sin embargo, en el caso de los pacientes con tumores MSI-H se observa una tendencia a presentar una mejor supervivencia en los pacientes sin metilación en este gen ( $p = 0,06$ ; Tabla 28). Esta tendencia se observa también en los porcentajes de supervivientes tanto a los 3 como a los 5 años (Tabla 28).

MSI	Met <i>MLHI</i>	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
MSS	No (98)	43,7 $\pm$ 23,3	61/98 (62,24%)	23/98 (23,47%)
	Si (10)	46,7 $\pm$ 27,4	6/10 (60%)	4/10 (40%)
MSI-L	No (10)	29,7 $\pm$ 25,5	4/10 (40%)	1/10 (10%)
	Si (7)	44,1 $\pm$ 26,4	4/7 (57,14%)	2/7 (28,57%)
MSI-H	No (6)	54,1 $\pm$ 15,2	5/6 (83,33%)	2/6 (33,33%)
	Si (10)	31,6 $\pm$ 24,2	4/10 (40%)	1/10 (10%)

**Tabla 28.** Supervivencia media de los pacientes con metilación en el gen *MLHI* según el nivel de MSI del tumor.

Las curvas de Kaplan-Meier demuestran que los pacientes con tumores MSI-H y sin metilación en *MLHI* presentan una ventaja en la supervivencia, aunque esta comparación no alcanza una significación estadística (log rank  $P = 0,1$ ; Figura 46C); por el contrario, los pacientes con tumores MSI-L y con *MLHI* metilado presentan una mejor supervivencia, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (log rank  $P = 0,3$ ; Figura 46B). Por último, la

metilación de *MLH1* no afecta a la supervivencia de los pacientes con tumores MSS (log rank P = 0,3; Figura 46A).



**Figura 46 A, B y C.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes en función de la metilación del promotor de *MLH1* en los diferentes niveles MSI.

### Gen *MSH2*

#### METILACIÓN DE *MSH2* Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS

La Tabla 29 resume las características clinicopatológicas de los tumores en relación con la metilación del promotor de *MSH2*.

Los pacientes sin metilación en el promotor de *MSH2* presentan una media de edad ligeramente superior a la de los pacientes con el promotor metilado ( $67,52 \pm 12,1$  años y un rango de 32-93 años, frente a  $64,8 \pm 17,2$  años y un rango de 16-84 años, respectivamente), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,4$ ). Por otra parte, un 18,8% de los tumores con el gen *MSH2* metilado son de pacientes menores de 50 años de edad en comparación con un 10,4% de estos tumores que pertenecen a pacientes mayores de 50 años, aunque esta asociación no es estadísticamente significativa ( $p = 0,3$ ; Tabla 29). El 30% (9/30) de los tumores con metilación en el gen *MSH2* presentan una localización derecha, frente al pequeño porcentaje de tumores de colon izquierdo con esta característica (6,3%;  $\chi^2 = 13,17$ ;  $p = 0,001$ ; Tabla 29).

Los tumores en el estadio D de Duke presentaban una alta tasa de metilación de *MSH2* (20,8%: 5/24), seguidos por los tumores del estadio B (16,7%: 9/54;  $\chi^2 = 8,39$ ;  $p = 0,03$ ). Cuando analizamos conjuntamente los estadios de Duke A+B y C+D, observamos que los tumores en el estadio temprano de desarrollo (A+B) son los que presentan una alta frecuencia de metilación (15,4%: 10/65) frente a los que están en el estadio tardío (C+D) (7,9%: 6/76), sin embargo esta comparación no alcanza significación estadística ( $p = 0,1$ ; Tabla 29). No se observan más asociaciones entre la metilación de *MSH2* y las demás variables clinicopatológicas (Tabla 29).

Variable	Metilación <i>MSH2</i>		p
	No	Si	
<b>Sexo</b>			
Varones	72 (88,9%)	9 (11,1%)	ns
Mujeres	53 (88,3%)	7 (11,7%)	
<b>Media de edad</b>	67,5 ± 12,1 años	64,8 ± 17,2 años	ns
<b>Edad</b>			
≤50 años	13 (81,3%)	3 (18,8%)	ns
>50 años	112 (89,6%)	13 (10,4%)	
<b>Localización</b>			
Derecha	21 (70%)	9 (30%)	<b>0,001</b>
Izquierda	104 (93,7%)	7 (6,3%)	
<b>Estadios de Dukes</b>			
A	9 (90%)	1 (10%)	<b>0,03</b>
B	45 (83,3%)	9 (16,7%)	
C	52 (98,1%)	1 (1,9%)	
D	19 (79,2%)	5 (20,8%)	
A+B	55 (84,6%)	10 (15,4%)	ns
C+D	70 (92,1%)	6 (7,9%)	
<b>Grado de diferenciación</b>			
Bien	53 (85,5%)	9 (14,5%)	ns
Moderado	62 (93,9%)	4 (6,1%)	
Pobre	10 (76,9%)	3 (23,1%)	
<b>Recurrencia local</b>			
No	90 (87,4%)	13 (12,6%)	ns
Si	12 (100%)	0 (0%)	
<b>Persistencia (metástasis)</b>			
No	81 (89%)	10 (11%)	ns
Si	28 (84,8%)	5 (15,2%)	
<b>Invasión vascular</b>			
No	101 (88,6%)	13 (11,4%)	ns
Si	19 (95%)	1 (5%)	
<b>Fenotipo mucosecretor</b>			
No	111 (91,7%)	10 (8,3%)	ns
Si	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
<b>Total</b>	125/141 (88,65%)	16/141 (11,35%)	

En algunos casos no observamos un total de 125 o 16 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 29.** Características clinicopatológicas de los tumores con metilación en el gen *MSH2*.

## METILACIÓN DE *MSH2* Y VARIABLES GENÉTICAS

La Tabla 30 resume las características genéticas de los tumores en relación con la metilación del promotor de *MSH2*.

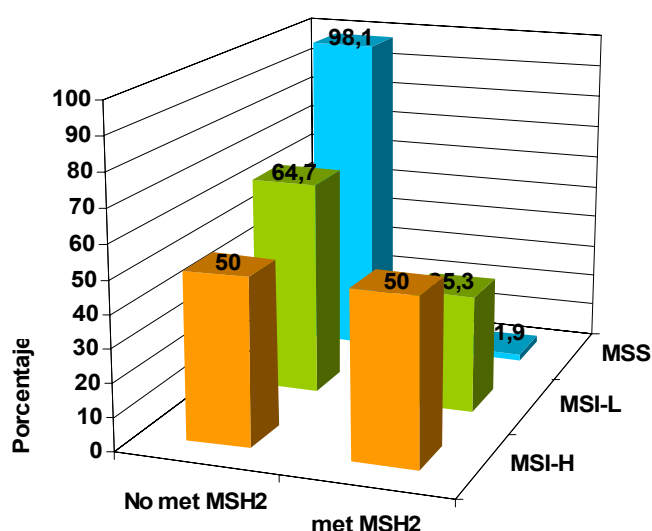
Variable	Metilación <i>MSH2</i>		p
	No	Si	
<b>MSI</b>			
MSS	106 (98,1%)	2 (1,9%)	<0,001
MSI-L	11 (64,7%)	6 (35,3%)	
MSI-H	8 (50%)	8 (50%)	
<b>MSI</b>			
MSS+MSI-L	117 (93,6%)	8 (6,4%)	<0,001
MSI-H	8 (50%)	8 (50%)	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>			
No	44 (89,8%)	5 (10,2%)	ns
Si	20 (76,9%)	6 (23,1%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>			
No	88 (88%)	12 (12%)	ns
Si	28 (87,5%)	4 (12,5%)	
<b>Mut <i>BAX</i></b>			
No	121 (89,6%)	14 (10,4%)	ns
Si	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
<b>Mut <i>TGFBR2</i></b>			
No	117 (92,1%)	10 (7,9%)	0,001
Si	8 (57,1%)	6 (42,9%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>			
No	111 (91%)	11 (9%)	ns
Si	12 (75%)	4 (25%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>			
No	90 (88,2%)	12 (11,8%)	ns
Si	25 (86,2%)	4 (13,8%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>			
No	60 (85,7%)	10 (14,3%)	ns
Si	6 (85,7%)	1 (14,3%)	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>			
No	108 (90,8%)	11 (9,2%)	0,03
Si	12 (70,6%)	5 (29,4%)	
<b>Total</b>	125/141 (88,65%)	16/141 (11,35%)	

En algunos casos no observamos un total de 125 o 16 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 30.** Características genéticas de los tumores con metilación en el gen *MSH2*.

Tal como ocurría en *MLH1*, se ha observado una relación entre el nivel de inestabilidad de los microsatélites y la metilación del gen *MSH2*: El 50% (8/16) de los tumores MSI-H presentan esta alteración, seguidos por los tumores MSI-L con una tasa de metilación del 35,3% (6/17); y por último los tumores estables con una frecuencia de metilación de sólo el 1,9% (2/108;  $\chi^2 = 43,13$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 30 y Figura 47). Al agrupar los tumores MSS y MSI-L, se observa que los tumores MSI-H presentan también una alta frecuencia de metilación en *MSH2* (50%), frente al grupo de tumores MSS+MSI-L (6,4%;  $\chi^2 = 21,9$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 30).

Un 42,9% (6/14) de los tumores con el gen *TGFBR2* mutado presentan metilación en *MSH2*, frente a sólo un 7,9% de los tumores sin mutaciones en este gen ( $\chi^2 = 15,34$ ;  $p = 0,001$ ; Tabla 30). Al contrario de lo que ocurría en el gen *MLH1*, el 29,4% (5/17) de los tumores con LOH en el gen *MSH2* también presentan metilación en este mismo gen ( $\chi^2 = 5,82$ ;  $p = 0,03$ ; Tabla 30). No se han observado más relaciones significativas entre la metilación de *MSH2* y las restantes variables genéticas (Tabla 30).



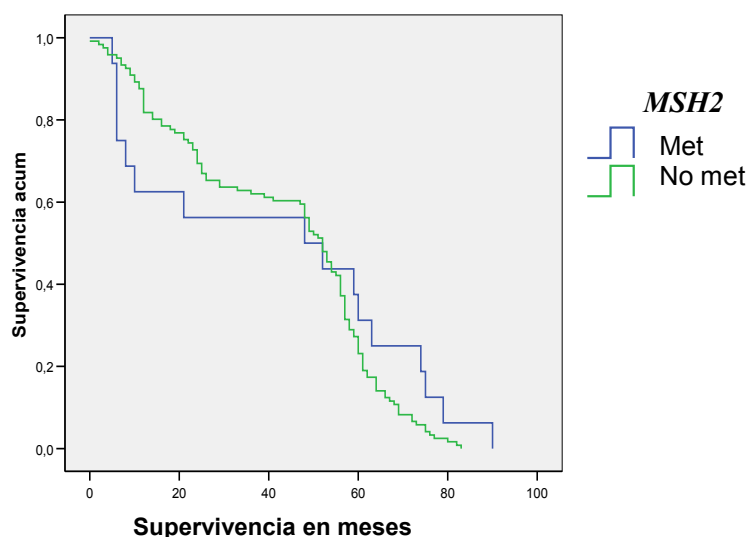
**Figura 47.** Distribución de los tumores en función del nivel de MSI y de la metilación de *MSH2*.

## METILACIÓN DE *MSH2* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

Los pacientes con el gen *MSH2* no metilado no presentan diferencias en la supervivencia respecto a los pacientes con metilación en *MSH2* ( $42,7 \pm 22,9$  meses vs.  $41,38 \pm 31,4$  meses;  $p = 0,8$  y log rank  $P = 0,2$ ; Tabla 31 y Figura 48 respectivamente).

Met <i>MSH2</i>	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
No (125)	$42,7 \pm 22,9$	75/125 (60%)	28/125 (22,4%)
Si (16)	$41,38 \pm 31,4$	9/16 (56,25%)	5/16 (31,25%)

**Tabla 31.** Supervivencia media de los pacientes con el gen *MSH2* metilado.



**Figura 48.** Curva Kaplan- Meier de supervivencia de los pacientes con el promotor del gen *MSH2* metilado.

### **METILACIÓN DE *MSH2* Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS EN FUNCIÓN DEL NIVEL MSI**

En varones, la mayoría de los tumores con *MSH2* metilado son MSI-L y MSI-H (50% y 33,3% respectivamente;  $\chi^2 = 20,88$ ;  $p < 0,001$ ), mientras que en mujeres la mayoría de los tumores con el gen *MSH2* metilado son MSI-H (71,4%;  $\chi^2 = 31,04$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 32). No existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de edad de los pacientes con y sin metilación de *MSH2* en los tumores con diferentes niveles de MSI. Sin embargo, en los tumores MSI-H de pacientes mayores de 50 años el gen *MSH2* está metilado más frecuentemente (53,8%: 7/13) que en los tumores MSI-L y MSS (26,7%: 4/15 y 2,1%: 2/97 respectivamente;  $\chi^2 = 37,83$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 32).

El 60% de los tumores MSI-H y el 50% de los tumores MSI-L con el gen *MSH2* metilado presentan una localización proximal, frente a los tumores MSS de localización derecha, todos ellos no metilados en *MSH2* ( $\chi^2 = 14,87$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 32). Un 60% (6/10) de los tumores MSI-H con metilación en *MSH2* están en el estadio B de Dukes, mientras que los tumores MSI-L con esta alteración están en los estadios D y B de Dukes (60% y 33,3% respectivamente;  $\chi^2 = 22,3$ ;  $p < 0,001$  para el estadio B y  $\chi^2 = 10,9$ ;  $p = 0,004$  para el estadio D). Cuando analizamos conjuntamente los estadios A+B y C+D, observamos que el 60% de los tumores MSI-H con *MSH2* metilado muestran estadios de desarrollo temprano (A+B) ( $\chi^2 = 23,6$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 32).

Los tumores MSI-H con el gen *MSH2* metilado se muestran bien o pobremente diferenciados, mientras que los tumores MSI-L están bien o moderadamente diferenciados ( $\chi^2 = 20,6$ ;  $p < 0,001$  para los tumores bien diferenciados;  $\chi^2 = 19,0$ ;  $p < 0,001$  para los tumores moderadamente diferenciados y  $\chi^2 = 6,2$ ;  $p = 0,04$  para los tumores pobremente diferenciados). Los tumores con metilación en *MSH2* no muestran recurrencia local ( $\chi^2 = 30,2$ ;  $p < 0,001$ ), ni



metástasis ( $\chi^2 = 34,9$ ;  $p < 0,001$ ), ni invasión vascular ( $\chi^2 = 34,5$ ;  $p < 0,001$ ), ni fenotipo mucosecretor ( $\chi^2 = 27,9$ ;  $p < 0,001$ ) independientemente del nivel de MSI (Tabla 32).

Variable		MSI	Metilación <i>MSH2</i>		p
			No	Si	
Sexo	Varones	MSS	62 (96,9%)	2 (3,1%)	<0,001
		MSI-L	4 (50%)	4 (50%)	
		MSI-H	6 (66,7%)	3 (33,3%)	
	Mujeres	MSS	44 (100%)	0 (0%)	<0,001
		MSI-L	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
		MSI-H	2 (28,6%)	5 (71,4%)	
Media de edad		MSS	67,2 ± 11,5	73,5 ± 6,3	ns
		MSI-L	69,7 ± 10,3	58,1 ± 23,5	ns
		MSI-H	68 ± 20,7	67,7 ± 12,8	ns
Edad	≤50 años	MSS	11 (100%)	0 (0%)	0,003
		MSI-L	0 (0%)	2 (100%)	
		MSI-H	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
	>50 años	MSS	95 (97,9%)	2 (2,1%)	<0,001
		MSI-L	11 (73,3%)	4 (26,7%)	
		MSI-H	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
Localización	Derecha	MSS	14 (100%)	0 (0%)	<0,001
		MSI-L	3 (50%)	3 (50%)	
		MSI-H	4 (40%)	6 (60%)	
	Izquierda	MSS	92 (97,9%)	2 (2,1%)	0,003
		MSI-L	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
		MSI-H	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
Estadios de Dukes	A	MSS	9 (90%)	1 (10%)	--
		MSI-L	--	--	
		MSI-H	--	--	
	B	MSS	35 (100%)	0 (0%)	<0,001
		MSI-L	6 (66,7%)	3 (33,3%)	
		MSI-H	4 (40%)	6 (60%)	
	C	MSS	45 (100%)	0 (0%)	0,008
		MSI-L	3 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	4 (80%)	1 (20%)	
	D	MSS	17 (94,4%)	1 (5,6%)	0,004
		MSI-L	2 (40%)	3 (60%)	
		MSI-H	0 (0%)	1 (100%)	
Total			125/141(88,65%)	16/141(11,35%)	

En algunos casos no observamos un total de 125 o 16 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 32.** Características clinicopatológicas de los tumores con metilación en *MSH2* según el nivel MSI.

Variable		MSI	Metilación <i>MSH2</i>		p
			No	Si	
Estadios de Dukes					
	A+B	MSS	45 (97,8%)	1 (2,2%)	<0,001
		MSI-L	6 (66,7%)	3 (33,3%)	
		MSI-H	4 (40%)	6 (60%)	
	C+D	MSS	61 (98,4%)	1 (1,6%)	<0,001
		MSI-L	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
		MSI-H	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
Grado de diferenciación					
	Bien	MSS	46 (95,8%)	2 (4,2%)	<0,001
		MSI-L	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
		MSI-H	2 (33,3%)	4 (66,7%)	
	Moderado	MSS	53 (100%)	0 (0%)	<0,001
		MSI-L	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
		MSI-H	4 (80%)	1 (20%)	
	Pobre	MSS	7 (100%)	0 (0%)	0,04
		MSI-L	1 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	2 (40%)	3 (60%)	
Recurrencia local					
	No	MSS	76 (97,4%)	2 (2,6%)	<0,001
		MSI-L	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
		MSI-H	6 (50%)	6 (50%)	
	Si	MSS	11 (100%)	--	ns
		MSI-L	--	--	
		MSI-H	1 (100%)	--	
Persistencia (metástasis)					
	No	MSS	70 (98,6%)	1 (1,4%)	<0,001
		MSI-L	7 (70%)	3 (30%)	
		MSI-H	4 (40%)	6 (60%)	
	Si	MSS	21 (95,5%)	1 (4,5%)	0,04
		MSI-L	4 (57,1%)	3 (42,9%)	
		MSI-H	3 (75%)	1 (25%)	
Invasión vascular					
	No	MSS	87 (97,8%)	2 (2,2%)	<0,001
		MSI-L	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
		MSI-H	6 (50%)	6 (50%)	
	Si	MSS	16 (100%)	0 (0%)	0,051
		MSI-L	1 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Fenotipo mucosecretor					
	No	MSS	96 (98%)	2 (2%)	<0,001
		MSI-L	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
		MSI-H	7 (58,3%)	5 (41,7%)	
	Si	MSS	6 (100%)	0 (0%)	ns
		MSI-L	1 (50%)	1 (50%)	
		MSI-H	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Total			125/141 (88,65%)	16/141(11,35%)	

En algunos casos no observamos un total de 125 o 16 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 32 (Cont).**

## METILACIÓN DE *MSH2* Y VARIABLES GENÉTICAS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE MSI

Los tumores MSI-L y MSS con el gen *MSH2* metilado presentan mutaciones en *KRAS2* (60% y 10% respectivamente). En los tumores MSI-H observamos el 100% pero hay sólo un caso;  $\chi^2 = 9,1$ ;  $p = 0,01$ ). Por otra parte, el 50% de los tumores MSI-H con metilación en *MSH2* no presenta mutación del gen *KRAS2* ( $\chi^2 = 17,0$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 33). El 53,8% (7/13) de los tumores MSI-H y el 33,3% (8/12) de los tumores MSI-L con metilación en *MSH2* no presentan LOH en *TP53* ( $\chi^2 = 34,8$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 33). Por otra parte, el 40% (2/3) de los tumores MSI-L con metilación en *MSH2* presenta LOH en *TP53* ( $\chi^2 = 6,1$ ;  $p = 0,04$ ; Tabla 33).

El 66,7% (2/3) de los tumores MSI-H con metilación en *MSH2* presenta el gen *BAX* mutado, sin embargo este resultado no es estadísticamente significativo. Por otra parte, el 35,3% (6/17) de los tumores MSI-L y el 46,2% (6/13) de los tumores MSI-H con metilación en *MSH2* no presentan mutaciones en *BAX* ( $\chi^2 = 37,3$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 33). La mayoría de los tumores MSI-H con metilación en *MSH2* presenta mutaciones en *TGFBR2* (66,7%;  $\chi^2 = 5,8$ ;  $p = 0,05$ ), al contrario de los tumores MSI-L (el 37,5% con metilación en *MSH2* no presenta mutación en *TGFBR2* ( $\chi^2 = 28,5$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 33)).

Una alta frecuencia de tumores MSI-H (60%: 3/5) y el 50% de los tumores MSI-L (1/2) con metilación en el gen *MSH2* presentan LOH en el gen *APC* ( $\chi^2 = 6,9$ ;  $p = 0,03$ ; Tabla 33). Los tumores MSI-H con el gen *MSH2* metilado no presentan LOH en *DCC* (60%: 6/4), mientras que el 50% (2/4) de los tumores MSI-L con metilación en *MSH2* presenta LOH en este gen ( $\chi^2 = 33,4$ ;  $p < 0,001$  y  $\chi^2 = 21,2$ ;  $p = 0,005$  respectivamente; Tabla 33).

Los tumores con *MSH2* metilado no presentan LOH en *MLH1* ( $\chi^2 = 17,1$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 33). Al contrario de lo observado en el caso de *MLH1*, observamos que 66,7% (4/6) de los tumores MSI-H con metilación en el gen *MSH2* presentan también LOH en este gen, mientras que el 38,5% de los tumores MSI-L y el 2,1% de los tumores MSS con metilación en *MSH2* no presentan LOH ( $\chi^2 = 7,3$ ;  $p = 0,02$  y  $\chi^2 = 30,3$ ;  $p < 0,001$  respectivamente; Tabla 33).

Variable		MSI	Metilación <i>MSH2</i>		p
			No	Si	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>					
	No	MSS	36 (100%)	0 (0%)	<0,001
		MSI-L	5 (71,4%)	2 (28,6%)	
		MSI-H	3 (50%)	3 (50%)	
	Si	MSS	18 (90%)	2 (10%)	0,01
		MSI-L	2 (40%)	3 (60%)	
		MSI-H	0 (0%)	1 (100%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>					
	No	MSS	74 (98,7%)	1 (1,3%)	<0,001
		MSI-L	8 (66,7%)	4 (33,3%)	
		MSI-H	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
	Si	MSS	23 (95,8%)	1 (4,2%)	0,04
		MSI-L	3 (60%)	2 (40%)	
		MSI-H	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
<b>Mut <i>BAX</i></b>					
	No	MSS	103 (98,1%)	2 (1,9%)	<0,001
		MSI-L	11 (64,7%)	6 (35,3%)	
		MSI-H	7 (53,8%)	6 (46,2%)	
	Si	MSS	3 (100%)	0 (0%)	ns
		MSI-L	--	--	
		MSI-H	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
<b>Mut <i>TGFBR2</i></b>					
	No	MSS	102 (98,1%)	2 (1,9%)	<0,001
		MSI-L	10 (62,5%)	6 (37,5%)	
		MSI-H	5 (71,4%)	2 (28,6%)	
	Si	MSS	4 (100%)	0 (0%)	0,05
		MSI-L	1 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	3 (33,3%)	6 (66,7%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>					
	No	MSS	95 (97,9%)	2 (2,1%)	<0,001
		MSI-L	10 (66,7%)	5 (33,3%)	
		MSI-H	6 (60%)	4 (40%)	
	Si	MSS	9 (100%)	0 (0%)	0,03
		MSI-L	1 (50%)	1 (50%)	
		MSI-H	2 (40%)	3 (60%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>					
	No	MSS	77 (97,5%)	2 (2,5%)	<0,001
		MSI-L	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
		MSI-H	4 (40%)	6 (60%)	
	Si	MSS	20 (100%)	0 (0%)	0,005
		MSI-L	2 (50%)	2 (50%)	
		MSI-H	3 (60%)	2 (40%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>					
	No	MSS	49 (96,1%)	2 (3,9%)	<0,001
		MSI-L	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
		MSI-H	4 (50%)	4 (50%)	
	Si	MSS	6 (100%)	1 (0%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	1 (100%)	
		MSI-H	--	--	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>					
	No	MSS	94 (97,9%)	2 (2,1%)	<0,001
		MSI-L	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
		MSI-H	6 (60%)	4 (40%)	
	Si	MSS	8 (100%)	0 (0%)	0,02
		MSI-L	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
		MSI-H	2 (33,3%)	4 (66,7%)	
<b>Total</b>			125/141 (88,65%)	16/141 (11,35%)	

En algunos casos no observamos un total de 125 o 16 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 33.** Características genéticas de los tumores con metilación en el gen *MSH2* en función del nivel MSI.

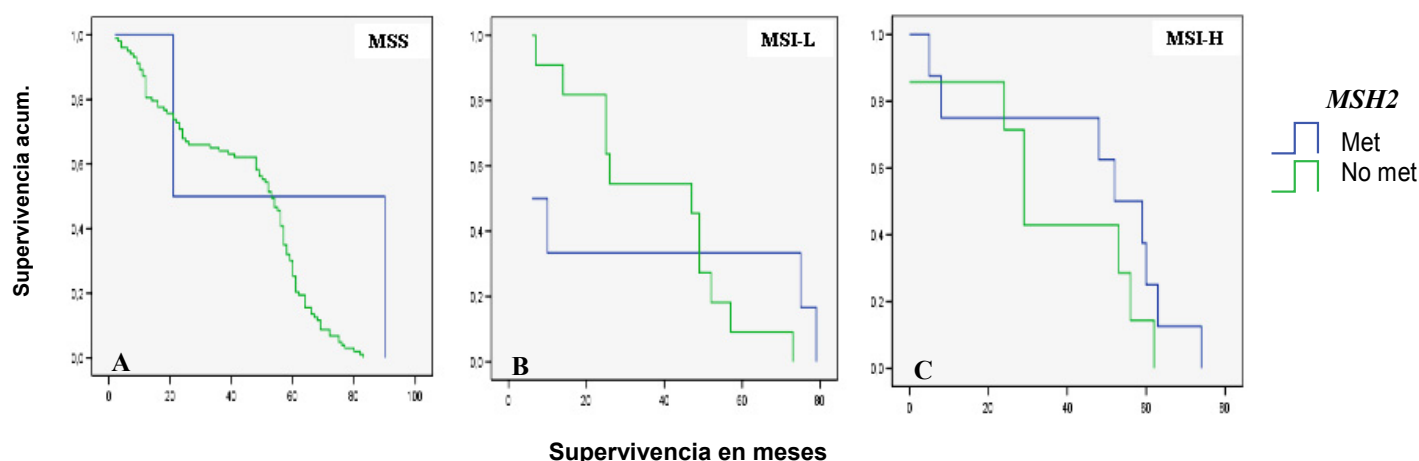
## METILACIÓN DE *MSH2* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE MSI

La metilación en el gen *MSH2* no afecta a la supervivencia de los pacientes ( $p = 0,4$ ;  $p = 0,5$  y  $p = 0,3$  para los tumores MSS, MSI-L y MSI-H respectivamente; Tabla 34).

MSI	Met <i>MSH2</i>	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
MSS	No (106)	43,8 ± 23,2	66/106 (62,26%)	26/106 (24,52%)
	Si (2)	55,5 ± 48,7	1/2 (50%)	1/2 (50%)
MSI-L	No (11)	38,5 ± 20,3	6/11 (54,54%)	1/11 (9,1%)
	Si (6)	30,3 ± 36,2	2/6 (33,33%)	2/6 (33,33%)
MSI-H	No (8)	34,0 ± 21,2	3/8 (37,5%)	1/8 (12,5%)
	Si (8)	46,1 ± 25,6	6/8 (75%)	2/8 (25%)

**Tabla 34.** Supervivencia media de los pacientes con metilación en el gen *MSH2* según el nivel de MSI del tumor.

Por otra parte, en el análisis de la supervivencia mediante las curvas de Kaplan-Meier, se observa que los pacientes con tumores MSS y metilación en *MSH2* presentan una tendencia a demostrar una mejor supervivencia (log rank  $P = 0,07$ ), sin embargo no podemos tener en cuenta este resultado puesto que hay solamente 2 pacientes es este grupo (Figura 49A). Las curvas de supervivencia de los pacientes con tumores MSI-L y MSI-H tampoco demuestran diferencias estadísticamente significativas (log rank  $P = 0,6$ ; Figura 49B y log rank  $P = 0,2$ ; Figura 49C, respectivamente).



**Figura 49 A, B y C.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes en función de la metilación del promotor de *MSH2* en los diferentes niveles de MSI.

## ANÁLISIS CONJUNTO DE LA METILACIÓN Y LA LOH DE LOS GENES *MLH1* Y *MSH2* EN EL GRUPO DE LOS TUMORES MSI-H

La Figura 50 resume la distribución de la LOH y la metilación del promotor de los genes *MLH1* y *MSH2* en el grupo de los tumores MSI-H.

		Tumores MSI-H															
		17	38	53	65	68	70	75	108	112	125	132	136	153	170	179	190
MLH1	LOH									-	-	-	-	-	-	-	-
	Met																
MSH2	LOH																
	Met																

**Figura 50.** Distribución de las alteraciones estudiadas en *MLH1* y *MSH2* en el grupo de los tumores MSI-H. Las casillas (-) corresponden a casos perdidos.

En la figura 50 se observa que ningún tumor MSI-H de la serie analizada presenta la LOH y la metilación del gen *MLH1* juntamente. Al contrario, el 66,7% (4/6) de los tumores MSI-H con LOH en *MSH2* es igualmente portador de metilación en este gen.

### Gen *P16*

#### METILACIÓN DE *P16* Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS

No observamos diferencias con respecto a las medias de edad de los pacientes con y sin metilación en el gen *P16* ( $65,46 \pm 18,7$  años y un rango de 16-93 años, frente a  $67,4 \pm 12,05$  años y un rango de 32-91 años, respectivamente;  $p = 0,6$ ). Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en la metilación de *P16* entre los dos grupos de edad mayores y menores de 50 años, debido al escaso número de tumores con esta alteración en nuestra serie ( $p = 1,0$ ; Tabla 35).

Los tumores localizados en el colon proximal presentan una alta tasa de metilación en *P16* (26,7%; 8/30) frente a sólo el 4,5% (5/111) de los tumores localizados en colon distal ( $\chi^2 = 13,8$ ;  $p = 0,001$ ; Tabla 35). Los tumores en el estadio D de Dukes presentan una alta tasa de metilación en el gen *P16* (20,8%), seguidos por los tumores en el estadio B (13%;  $\chi^2 = 9,1$ ;  $p = 0,02$ ; Tabla 35). Los tumores pobremente diferenciados presentan frecuentemente metilado el gen *P16* (38,5%) en comparación con los tumores bien y moderadamente diferenciados (8,1% y 4,5% respectivamente,  $\chi^2 = 15,1$ ;  $p = 0,001$ ; Tabla 35). Por último, los tumores con el fenotipo mucosecretor se encuentran frecuentemente metilados en *P16* (36,4%) en comparación con los tumores que no presentan esta característica (5,8%;  $\chi^2 = 12,3$ ;  $p = 0,007$ ; Tabla 35).

Variable	Metilación <i>P16</i>		p
	No	Si	
<b>Sexo</b>			
Varones	73 (90,1%)	8 (9,9%)	ns
Mujeres	55 (91,7%)	5 (8,3%)	
<b>Media de edad</b>	67,4 ± 12,0 años	65,4 ± 18,7 años	ns
<b>Edad</b>			
≤50 años	15 (93,8%)	1 (6,3%)	ns
>50 años	113 (90,4%)	12 (9,6%)	
<b>Localización</b>			
Derecha	22 (73,3%)	8 (26,7%)	<b>0,001</b>
Izquierda	106 (95,5%)	5 (4,5%)	
<b>Estadios de Dukes</b>			
A	10 (100%)	0 (0%)	<b>0,02</b>
B	47 (87%)	7 (13%)	
C	52 (98,1%)	1 (1,9%)	
D	19 (79,2%)	5 (20,8%)	
<b>Grado de diferenciación</b>			
Bien	57 (91,9%)	5 (8,1%)	<b>0,001</b>
Moderado	63 (95,5%)	3 (4,5%)	
Pobre	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
<b>Recurrencia local</b>			
No	92 (89,3%)	11 (10,7%)	ns
Si	12 (100%)	0 (0%)	
<b>Persistencia (metástasis)</b>			
No	84 (92,3%)	7 (7,7%)	ns
Si	28 (84,8%)	5 (15,2%)	
<b>Invasión vascular</b>			
No	104 (91,2%)	10 (8,8%)	ns
Si	18 (90%)	2 (10%)	
<b>Fenotipo mucosecretor</b>			
No	114 (94,2%)	7 (5,8%)	<b>0,007</b>
Si	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
<b>Total</b>	128/141(90,78%)	13/141 (9,21%)	

En algunos casos no observamos un total de 128 o 13 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 35.** Características clinicopatológicas de los tumores con metilación en el gen *P16*.

## METILACIÓN DE *P16* Y VARIABLES GENÉTICAS

La metilación del promotor de *P16*, igual que *MLH1* y *MSH2*, está directamente relacionada con el nivel de inestabilidad de los microsatélites. Así, observamos que los tumores MSI-H se presentan frecuentemente metilados (43,8%: 7/16), seguidos por los tumores MSI-L (29,4%: 5/17) y de los tumores MSS (0,9%: 1/108;  $\chi^2 = 39,95$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 36 y Figura 51). Estas diferencias se mantienen igualmente cuando comparamos los tumores MSI-H (7/16: 43,8%) con los tumores MSS+MSI-L (6/125: 4,8%;  $\chi^2 = 25,71$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 36).

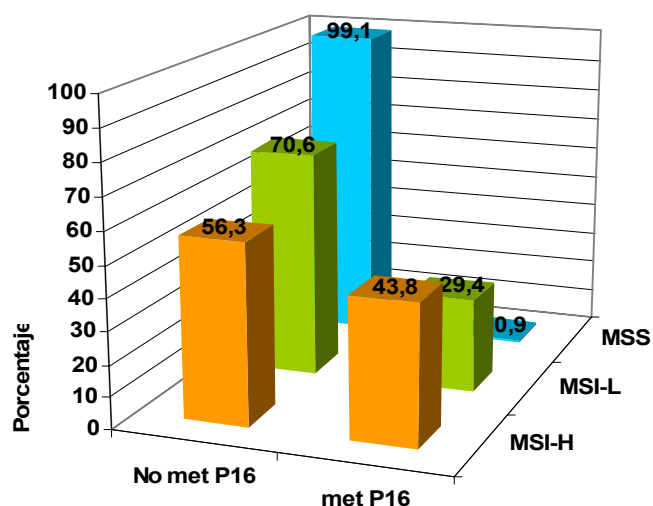
Los tumores con mutaciones en *BAX* presentan frecuentemente metilación del gen *P16*, lo que no ocurre con aquellos sin mutaciones en *BAX* (50% vs. 7,4%;  $\chi^2 = 12,45$ ;  $p = 0,01$ ). Igualmente, los tumores con *TGFBR2* mutado se asocian frecuentemente a la metilación en el gen *P16* (50%;  $\chi^2 = 30,88$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 36); y también los tumores con LOH en *APC* presentan una alta frecuencia de metilación en *P16* (25%;  $\chi^2 = 6,06$ ;  $p = 0,03$ ; Tabla 36).

Variable	Metilación <i>P16</i>		p
	No	Si	
<b>MSI</b>			
MSS	107 (99,1%)	1 (0,9%)	<0,001
MSI-L	12 (70,6%)	5 (29,4%)	
MSI-H	9 (56,3%)	7 (43,8%)	
<b>MSI</b>			
MSS+MSI-L	119 (95,2%)	6 (4,8%)	<0,001
MSI-H	9 (56,3%)	7 (43,8%)	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>			
No	46 (93,9%)	3 (6,1%)	ns
Si	23 (88,5%)	3 (11,5%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>			
No	90 (90%)	10 (10%)	ns
Si	29 (90,6%)	3 (9,4%)	
<b>Mut <i>BAX</i></b>			
No	125 (92,6%)	10 (7,4%)	0,01
Si	3 (50%)	3 (50%)	
<b>Mut <i>TGFBR2</i></b>			
No	121 (95,3%)	6 (4,7%)	<0,001
Si	7 (50%)	7 (50%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>			
No	114 (93,4%)	8 (6,6%)	0,03
Si	12 (75%)	4 (25%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>			
No	92 (90,2%)	10 (9,8%)	ns
Si	27 (93,1%)	2 (6,9%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>			
No	63 (90%)	7 (10%)	ns
Si	7 (100%)	0 (0%)	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>			
No	109 (91,6%)	10 (8,4%)	ns
Si	14 (82,4%)	3 (17,6%)	
<b>Total</b>	128/141 (90,78%)	13/141 (9,21%)	

En algunos casos no observamos un total de 128 o 13 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 36.** Características genéticas de los tumores con metilación en el gen *P16*.





**Figura 51.** Distribución de los tumores en función del nivel de MSI y de la metilación de *P16*.

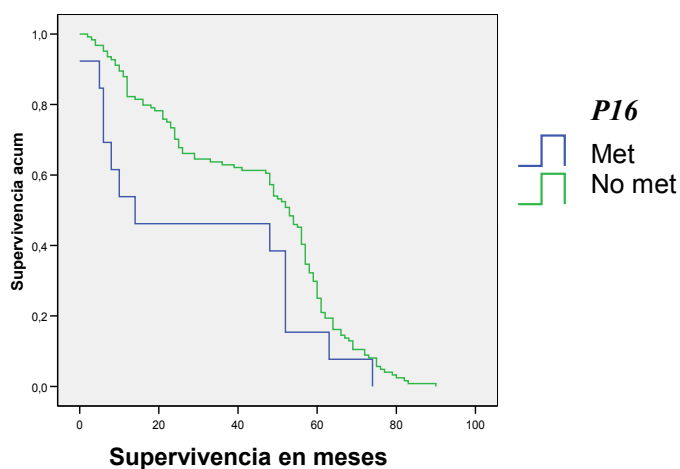
### METILACIÓN DE *P16* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

Los pacientes con *P16* metilado presentan una media de supervivencia significativamente menor que los pacientes que no presentan esta alteración ( $30,0 \pm 26,7$  meses vs.  $43,8 \pm 23,3$  meses;  $p = 0,04$ ; Tabla 37).

Met <i>P16</i>	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
No (128)	$43,8 \pm 23,3$	78/128 (60,94%)	31/128 (24,22%)
Si (13)	$30,0 \pm 26,7$	6/13 (46,15%)	2/13 (15,39%)

**Tabla 37.** Supervivencia media de los pacientes con el gen *P16* metilado.

La curva de supervivencia de Kaplan-Meier confirma este resultado, mostrando una ventaja en la supervivencia de los pacientes portadores del gen *P16* normal (log rank  $P = 0,03$ ; Figura 52).



**Figura 52.** Curva Kaplan- Meier de supervivencia de los pacientes en función de la metilación del promotor de *P16*.

## METILACIÓN DE *P16* Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE MSI

En varones, se observa una alta frecuencia de metilación del gen *P16* en los tumores MSI-L (50%), seguidos por los tumores MSI-H (33,3%;  $\chi^2 = 25,0$ ;  $p < 0,001$ ). En mujeres, un 57,1% de los tumores MSI-H presenta metilación en el gen *P16*, frente a un 11,1% en los tumores MSI-L ( $\chi^2 = 25,92$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 38). No existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de edad de los tumores MSS, MSI-L y MSI-H, en función de la metilación de *P16* ( $p = 0,8$ ;  $p = 0,4$ ;  $p = 0,1$  respectivamente). Por otra parte, los tumores inestables MSI-L y MSI-H de pacientes mayores de 50 años presentan metilación en el gen *P16* (26,7% y 53,8% respectivamente), en comparación con los tumores MSS que no presentan esta alteración ( $\chi^2 = 42,56$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 38).

Un 60% de los tumores MSI-H y un 33,3% de los tumores MSI-L con localización derecha presenta metilación en *P16* ( $\chi^2 = 10,9$ ;  $p = 0,004$ ; Tabla 38). La mayoría de los tumores MSI-H con el gen *P16* metilado están en el estadio B de Dukes (50%; aunque observamos 100% de estos tumores en el estadio D, hay solamente un caso;  $\chi^2 = 15,35$ ;  $p < 0,001$ ); y la mayoría de los tumores MSI-L con *P16* metilado están en el estadio D de Dukes ( $\chi^2 = 19,14$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 38). Esta distribución se mantiene cuando comparamos con los estadios A+B y C+D ( $\chi^2 = 19,55$ ;  $p < 0,001$  para los estadios A+B y  $\chi^2 = 30,15$ ;  $p < 0,001$  para los estadios C+D; Tabla 38). Los tumores MSI-H con el gen *P16* metilado son frecuentemente pobremente diferenciados (80%: 4/5). Observamos que 100% de los tumores MSI-L presenta también esta característica pero hay sólo un caso ( $\chi^2 = 9,62$ ;  $p = 0,008$ ). Por otra parte, el 37,5% (3/8) de los tumores MSI-L con metilación en *P16* son bien diferenciados ( $\chi^2 = 18,72$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 38).

Los tumores MSI-L y MSI-H con el gen *P16* metilado no presentan recurrencia local ( $\chi^2 = 29,81$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 38). El 50% de los tumores MSI-H con *P16* metilado no presentan metástasis (50%;  $\chi^2 = 33,25$ ;  $p < 0,001$ ; en el grupo de los tumores sin metástasis). Por otra parte, el 42,9% de los tumores MSI-L con *P16* metilado presenta metástasis ( $\chi^2 = 6,40$ ;  $p = 0,04$ ; Tabla 38). La mayoría de los tumores MSI-H y MSI-L con metilación en *P16* no presentan invasión vascular; aunque observamos que 100% de los tumores MSI-L con metilación en *P16* sí que presenta esta característica, pero hay solamente un caso ( $\chi^2 = 30,59$ ;  $p < 0,001$  y  $\chi^2 = 12,02$ ;  $p = 0,002$  respectivamente; Tabla 38). Los tumores MSI-H y MSI-L con metilación en *P16* presentan frecuentemente el fenotipo mucosecretor ( $\chi^2 = 9,1$ ;  $p = 0,01$ ; Tabla 38).

Variable		MSI	Metilación <i>P16</i>		p
			No	Si	
Sexo	Varones	MSS	63 (98,4%)	1 (1,6%)	<0,001
		MSI-L	4 (50%)	4 (50%)	
		MSI-H	6 (66,7%)	3 (33,3%)	
	Mujeres	MSS	44 (100%)	0 (0%)	<0,001
		MSI-L	8 (88,9%)	1 (11,1%)	
		MSI-H	3 (42,9%)	4 (57,1%)	
Media de edad		MSS	67,3 ± 11,5	65 (1 caso)	ns
		MSI-L	69,3 ± 10,8	56,8 ± 24,9	ns
		MSI-H	64,8 ± 19,0	71,7 ± 13,3	ns
Edad	≤50 años	MSS	11 (100%)	0 (0%)	0,02
		MSI-L	1 (50%)	1 (50%)	
		MSI-H	3 (100%)	0 (0%)	
	>50 años	MSS	96 (99%)	1 (1%)	<0,001
		MSI-L	11 (73,3%)	4 (26,7%)	
		MSI-H	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
Localización	Derecha	MSS	14 (100%)	0 (0%)	0,004
		MSI-L	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
		MSI-H	4 (40%)	6 (60%)	
	Izquierda	MSS	93 (98,9%)	1 (1,1%)	<0,001
		MSI-L	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
		MSI-H	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
Estadios de Dukes	A	MSS	10 (100%)	--	--
		MSI-L	--	--	
		MSI-H	--	--	
	B	MSS	34 (97,1%)	1 (2,9%)	<0,001
		MSI-L	8 (88,9%)	1 (11,1%)	
		MSI-H	5 (50%)	5 (50%)	
	C	MSS	45 (100%)	0 (0%)	0,008
		MSI-L	3 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	4 (80%)	1 (20%)	
	D	MSS	18 (100%)	0 (0%)	<0,001
		MSI-L	1 (20%)	4 (80%)	
		MSI-H	0 (0%)	1 (100%)	
	A+B	MSS	45 (97,8%)	1 (2,2%)	<0,001
		MSI-L	8 (88,9%)	1 (11,1%)	
		MSI-H	5 (50%)	5 (50%)	
	C+D	MSS	62 (100%)	0 (0%)	<0,001
		MSI-L	4 (50%)	4 (50%)	
		MSI-H	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
Total			128/141(90,78%)	13/141 (9,21%)	

En algunos casos no observamos un total de 128 o 13 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 38.** Características clinicopatológicas de los tumores con metilación en *P16* según el nivel MSI.

Variable	MSI	Metilación <i>P16</i>		p		
		No	Si			
Grado de diferenciación						
	Bien	MSS	48 (100%)	0 (0%)	<0,001	
		MSI-L	5 (62,5%)	3 (37,5%)		
		MSI-H	4 (66,7%)	2 (33,3%)		
	Moderado	MSS	52 (98,1%)	1 (1,9%)	ns	
		MSI-L	7 (87,5%)	1 (12,5%)		
		MSI-H	4 (80%)	1 (20%)		
	Pobre	MSS	7 (100%)	0 (0%)	0,008	
		MSI-L	0 (0%)	1 (100%)		
		MSI-H	1 (20%)	4 (80%)		
Recurrencia local						
	No	MSS	77 (98,7%)	1 (1,3%)	<0,001	
		MSI-L	8 (61,5%)	5 (38,5%)		
		MSI-H	7 (58,3%)	5 (41,7%)		
	Si	MSS	11 (100%)	--	ns	
		MSI-L	--	--		
		MSI-H	1 (100%)	--		
	Persistencia (metástasis)					
		No	MSS	71 (100%)	0 (0%)	<0,001
			MSI-L	8 (80%)	2 (20%)	
MSI-H			5 (50%)	5 (50%)		
Si		MSS	21 (95,5%)	1 (4,5%)	0,04	
		MSI-L	4 (57,1%)	3 (42,9%)		
		MSI-H	3 (75%)	1 (25%)		
Invasión vascular						
		No	MSS	88 (98,9%)	1 (1,1%)	<0,001
			MSI-L	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
	MSI-H		7 (58,3%)	5 (41,7%)		
	Si	MSS	16 (100%)	0 (0%)	0,002	
		MSI-L	0 (0%)	1 (100%)		
		MSI-H	2 (66,7%)	1 (33,3%)		
	Fenotipo mucosecretor					
		No	MSS	97 (99%)	1 (1%)	<0,001
			MSI-L	9 (81,8%)	2 (18,2%)	
MSI-H			8 (66,7%)	4 (33,3%)		
Si		MSS	6 (100%)	0 (0%)	0,01	
		MSI-L	0 (0%)	2 (100%)		
		MSI-H	1 (33,3%)	2 (66,7%)		
Total		128/141 (90,78%)	13/141 (9,21%)			

En algunos casos no observamos un total de 128 o 13 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 38 (Cont).**

## **METILACIÓN DE *P16* Y VARIABLES GENÉTICAS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE MSI**

Los tumores MSI-L y MSI-H con mutaciones en el gen *KRAS2* presentan una incidencia más alta de metilación en el gen *P16* (40% y 100% respectivamente, aunque hay solamente un tumor en este último caso;  $\chi^2 = 14,24$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 39). Los tumores MSI-H con metilación en el gen *P16* no presentan LOH en el gen *TP53* (46,2%;  $\chi^2 = 28,14$ ;  $p < 0,001$ ), mientras que los tumores MSI-L con metilación en *P16* si que la presentan (40%,  $\chi^2 = 16,7$ ;  $p = 0,007$ ; Tabla 39).

Todos los tumores MSI-H (100%) con el gen *P16* metilado presentan mutaciones en *BAX*, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa. Por otra parte, el 29,4% de los tumores MSI-L y el 30,8% de los tumores MSI-H con metilación en *P16* no presentan mutaciones en *BAX* ( $\chi^2 = 28,72$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 39). Los tumores MSI-H portadores del gen *P16* metilado presentan una mayor incidencia de mutaciones en *TGFBR2* (66,7%) aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa ( $p = 0,2$ ). Los tumores MSI-L con metilación en *P16*, sin embargo, no presentan mutaciones en *TGFBR2* ( $\chi^2 = 31,58$ ;  $p < 0,001$ ; Tabla 39). El 80% de los tumores MSI-H con *P16* metilado presenta LOH en el gen *APC* ( $\chi^2 = 11,73$ ;  $p = 0,003$ ); mientras que los tumores MSI-L no presentan tal alteración ( $\chi^2 = 25,33$ ;  $p < 0,001$ ). El 50% de los tumores MSI-L con metilación en *P16* presenta LOH en *DCC*, al contrario de los tumores MSI-H (el 70% de éstos con metilación en *P16* no presenta LOH en *DCC*;  $\chi^2 = 14,06$ ;  $p = 0,001$  y  $\chi^2 = 52,15$ ;  $p < 0,001$  respectivamente; Tabla 39). Los tumores con *P16* metilado no presentan LOH en *MLH1* ( $\chi^2 = 20,88$ ;  $p < 0,001$ ). Por último, el 50% de los tumores MSI-H con *P16* metilado presenta LOH en *MSH2*; mientras que el 38,5% de los tumores MSI-L con *P16* metilado no presentan LOH en *MSH2* ( $\chi^2 = 6,97$ ;  $p = 0,03$  y  $\chi^2 = 34,98$ ;  $p < 0,001$  respectivamente; Tabla 39).

Variable		MSI	Metilación <i>P16</i>		p
			No	Si	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>					
	No	MSS	36 (100%)	0 (0%)	<b>0,008</b>
		MSI-L	5 (71,4%)	2 (28,6%)	
		MSI-H	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
	Si	MSS	20 (100%)	0 (0%)	<b>0,001</b>
		MSI-L	3 (60%)	2 (40%)	
		MSI-H	0 (0%)	1 (100%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>					
	No	MSS	74 (98,7%)	1 (1,3%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	9 (75%)	3 (25%)	
		MSI-H	7 (53,8%)	6 (46,2%)	
	Si	MSS	24 (100%)	0 (0%)	<b>0,007</b>
		MSI-L	3 (60%)	2 (40%)	
		MSI-H	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
<b>Mut <i>BAX</i></b>					
	No	MSS	104 (99%)	1 (1%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	12 (70,6%)	5 (29,4%)	
		MSI-H	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
	Si	MSS	3 (100%)	0 (0%)	ns
		MSI-L	--	--	
		MSI-H	0 (0%)	3 (100%)	
<b>Mut <i>TGFBR2</i></b>					
	No	MSS	104 (100%)	0 (0%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	11 (68,8%)	5 (31,3%)	
		MSI-H	6 (85,7%)	1 (14,3%)	
	Si	MSS	3 (75%)	1 (25%)	ns
		MSI-L	1 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	3 (33,3%)	6 (66,7%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>					
	No	MSS	96 (99%)	1 (1%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	10 (66,7%)	5 (33,3%)	
		MSI-H	8 (80%)	2 (20%)	
	Si	MSS	9 (100%)	0 (0%)	<b>0,003</b>
		MSI-L	2 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	1 (20%)	4 (80%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>					
	No	MSS	79 (100%)	0 (0%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	10 (76,9%)	3 (23,1%)	
		MSI-H	3 (30%)	7 (70%)	
	Si	MSS	20 (100%)	0 (0%)	<b>0,001</b>
		MSI-L	2 (50%)	2 (50%)	
		MSI-H	5 (100%)	0 (0%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>					
	No	MSS	51 (100%)	0 (0%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
		MSI-H	5 (62,5%)	3 (37,5%)	
	Si	MSS	6 (100%)	--	ns
		MSI-L	1 (100%)	--	
		MSI-H	--	--	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>					
	No	MSS	95 (99%)	1 (1%)	<b>&lt;0,001</b>
		MSI-L	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
		MSI-H	6 (60%)	4 (40%)	
	Si	MSS	8 (100%)	0 (0%)	<b>0,03</b>
		MSI-L	3 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	3 (50%)	3 (50%)	
<b>Total</b>			128/141 (90,78%)	13/141 (9,21%)	

En algunos casos no observamos un total de 128 o 13 casos por la existencia de casos perdidos.

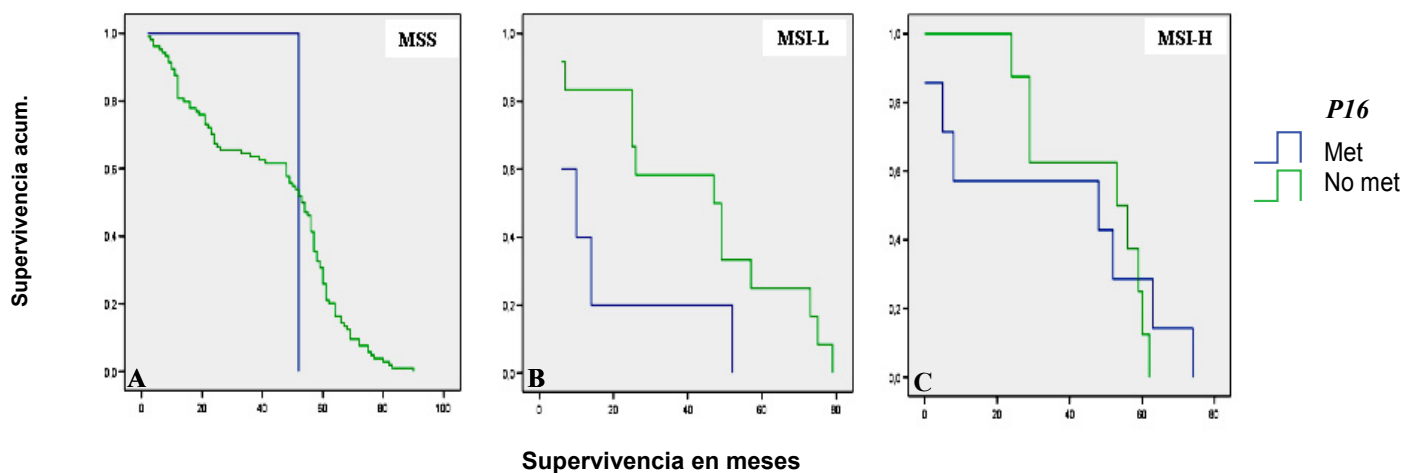
**Tabla 39.** Características genéticas de los tumores con metilación en el gen *P16* en función del nivel MSI.

## METILACIÓN DE *P16* Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE MSI

La supervivencia media de los pacientes con tumores MSS y MSI-H no se ve alterada por la presencia de metilación en *P16* (Tabla 40:  $p = 0,7$ , y  $p = 0,5$  para los MSS y los MSI-H respectivamente) (Figura 53A: log rank  $P = 0,6$ , en los MSS; Figura 53C: log rank  $P = 0,8$ , para los MSI-H). En los tumores MSI-L la metilación en *P16* parece afectar negativamente la supervivencia de los pacientes, aunque la diferencia no alcanza la significación ( $p = 0,06$ , Tabla 40). Sin embargo el log rank de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier resulta estadísticamente significativo (log rank  $P = 0,04$ ; Figura 53B).

MSI	Met <i>P16</i>	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
MSS	No (107)	43,9 ± 23,7	66/107 (61,69%)	27/107 (25,23%)
	Si (1)	52 (1 caso)	1/1 (100%)	--
MSI-L	No (12)	43,1 ± 25,4	7/12 (58,33%)	3/12 (25%)
	Si (5)	17,6 ± 19,5	1/5 (20%)	0/5 (0%)
MSI-H	No (9)	43,4 ± 17,6	5/9 (55,55%)	1/9 (11,11%)
	Si (7)	35,7 ± 30,5	4/7 (57,14%)	2/7 (28,57%)

**Tabla 40.** Supervivencia media de los pacientes con el gen *P16* metilado según el nivel de MSI del tumor.



**Figura 53 A, B y C.** Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes en función de la metilación del promotor de *P16* en los diferentes niveles de MSI.

## Gen *P15*

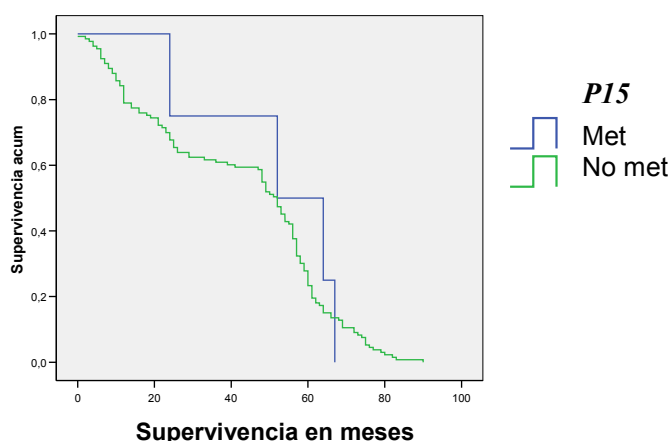
Sólo 4 tumores de los 141 analizados presentan metilación en el promotor del gen *P15* (2,83%), por lo tanto no se puede obtener datos estadísticos fiables en cuanto a la asociación de la metilación en este marcador con las características genéticas y clinicopatológicas de los tumores, o con la supervivencia de los pacientes.

No obstante, hemos observado que estos tumores comparten una serie de características comunes, aunque sin significación estadística salvo en un caso: Todos los tumores con metilación en el gen *P15* aparecen en pacientes mayores de 50 años de edad; están localizados en el colon distal; están en el estadio B de Dukes ( $p = 0,08$ ), y cuando comparamos los datos de estadios tempranos (A+B) con los tardíos (C+D), observamos que estos tumores están en estadios de desarrollo temprano (A+B) ( $\chi^2 = 4,81$ ;  $p = 0,04$ ). Por otra parte, estos tumores no se distribuyen de forma diferencial en relación con los diferentes niveles de MSI (Tabla 41).

MSI	Metilación <i>P15</i>		Total
	No	Si	
MSS	106 (98,1%)	2 (1,9%)	108
MSI-L	16 (94,1%)	1 (5,9%)	17
MSI-H	15 (93,8%)	1 (6,3%)	16
<b>Total</b>	137	4	141

**Tabla 41.** Distribución de los tumores en función del nivel de MSI y de la metilación de *P15*.

La curva de supervivencia de Kaplan-Meier demuestra que los pacientes con *P15* metilado presentan una mejor supervivencia, sin embargo, no se puede tener en cuenta este resultado puesto que hay solamente 4 pacientes portadores de la misma (log rank  $P = 0,6$ ; Figura 54).



**Figura 54.** Curva Kaplan-Meier de supervivencia de los pacientes en función de la metilación del promotor del gen *P15*.



## Gen *CDH1*

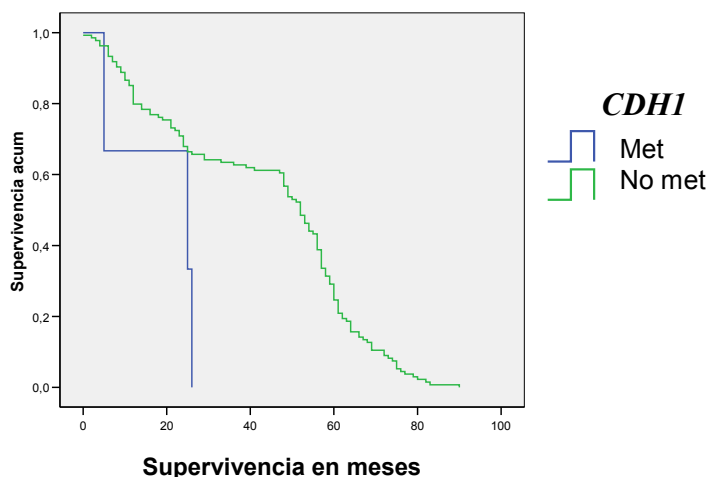
En el caso de *CDH1*, existen solamente 3 tumores portadores de metilación en el promotor de este gen de los 141 analizados (2,12%). Este hecho dificulta igualmente la realización de un análisis estadístico fiable.

Aún así, observamos que estos tumores presentan una serie de características: los 3 tumores con el gen *CDH1* metilado aparecen en mujeres, mayores de 50 años de edad y con metástasis. Dos de los tres tumores con *CDH1* metilado son MSI-L y el otro es MSI-H ( $\chi^2 = 11,23$ ;  $p = 0,004$ ; Tabla 42).

MSI	Metilación <i>CDH1</i>		Total
	No	Si	
MSS	108 (100%)	0 (0%)	108
MSI-L	15 (88,2%)	2 (11,8%)	17
MSI-H	15 (93,8%)	1 (6,3%)	16
<b>Total</b>	138	3	141

**Tabla 42.** Distribución de los tumores en función del nivel de MSI y de la metilación de *CDH1*.

En la curva de Kaplan-Meier se aprecia una mejor supervivencia de los pacientes con el gen *CDH1* no metilado (log rank  $P = 0,02$ ), aunque hay que tomar este resultado con reservas debido al escaso número de tumores con metilación en *CDH1* (Figura 55).

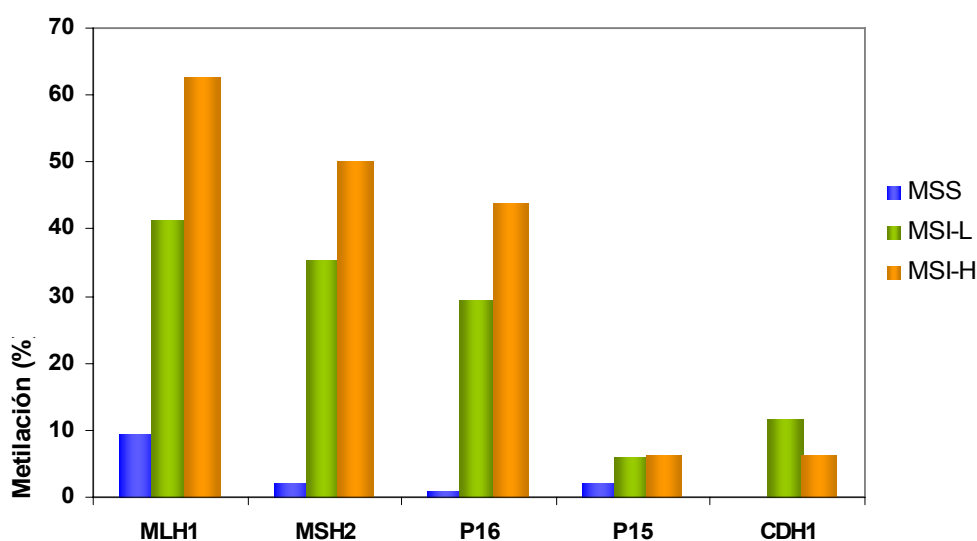


**Figura 55.** Curva Kaplan-Meier de supervivencia de los pacientes en función de la metilación del promotor del gen *CDH1*.

## DISTRIBUCIÓN DE LA METILACIÓN EN LOS CINCO GENES EN TUMORES CON DIFERENTES NIVELES DE MSI

*MLH1* es el marcador que presenta la tasa de metilación más alta (19,15%), seguido por *MSH2* (11,35%) y *P16* (9,2%); Mientras que *P15* y *CDH1* presentan las tasas de metilación más bajas (2,83% y 2,12% respectivamente; Figura 42).

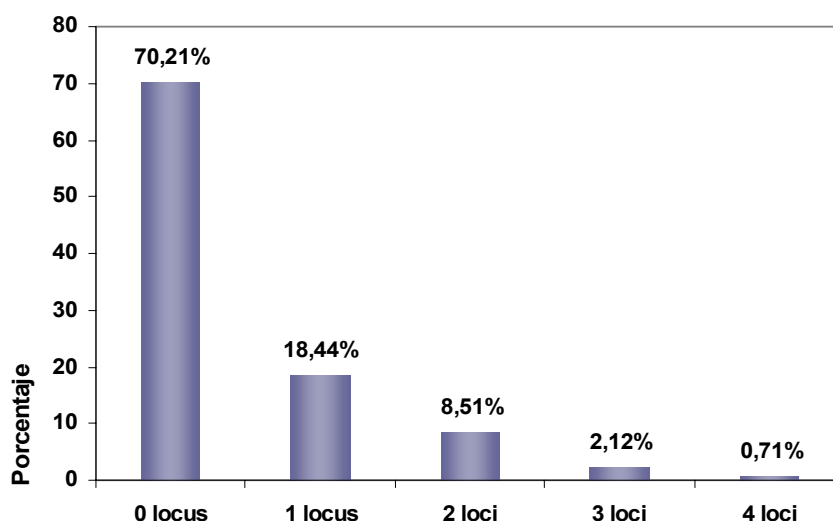
En la Figura 56 se observa, que existe una relación directa entre la metilación del promotor de los marcadores analizados y el nivel de MSI, puesto que los tumores MSI-H son los que muestran las frecuencias más altas de metilación en casi todos los marcadores, seguidos por los tumores MSI-L y por último los tumores estables MSS con unas frecuencias muy bajas.



**Figura 56.** Comparación de las frecuencias de metilación en los 5 marcadores analizados en función del nivel de MSI.

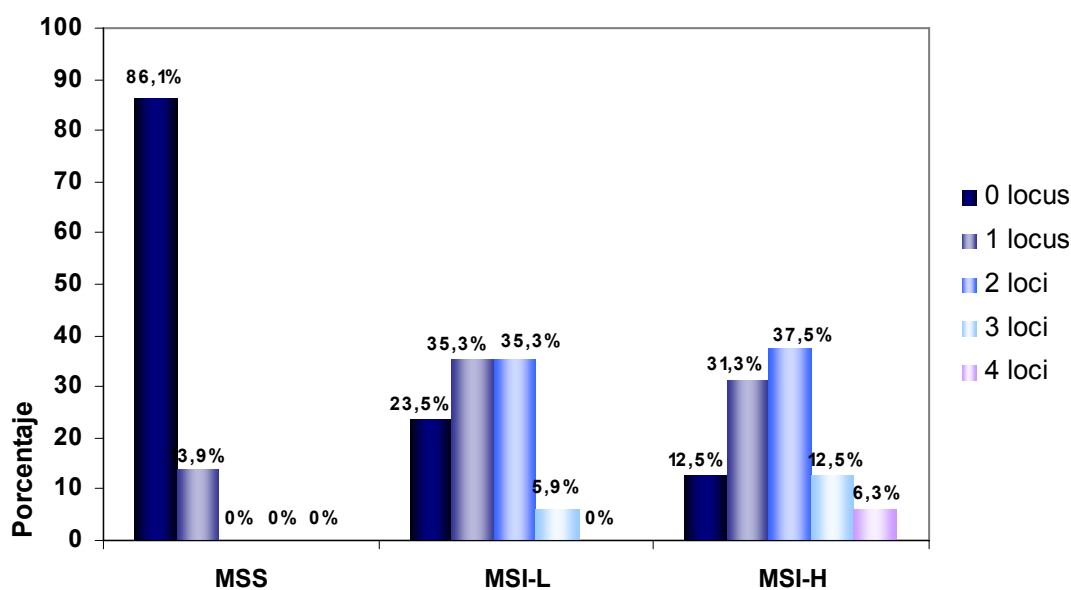
## FENOTIPO CIMP

Con el fin de determinar la posible existencia de un fenotipo metilador “CIMP”, hemos analizado la existencia simultánea de la metilación de los 5 promotores estudiados en cada uno de los tumores de nuestra serie. Ninguno de los tumores analizados presenta metilación en los 5 marcadores simultáneamente y sólo uno presenta esta alteración en 4 de los 5 marcadores analizados; mientras que 42 individuos (29,78%) presentan metilación en, al menos un marcador (Figura 57).



**Figura 57.** Comparación de las frecuencias de la metilación simultánea en los 5 marcadores analizados.

Cuando se realiza este análisis dentro de los grupos MSI, se observa que la presencia de la metilación simultánea en los tumores está estrechamente relacionada con el nivel de inestabilidad de estos, puesto que el único tumor portador de 4 loci metilados es MSI-H, mientras que los tumores que no presentan ningún locus metilado son estables ( $\chi^2 = 80,65$ ;  $p < 0,001$ ; Figura 58).



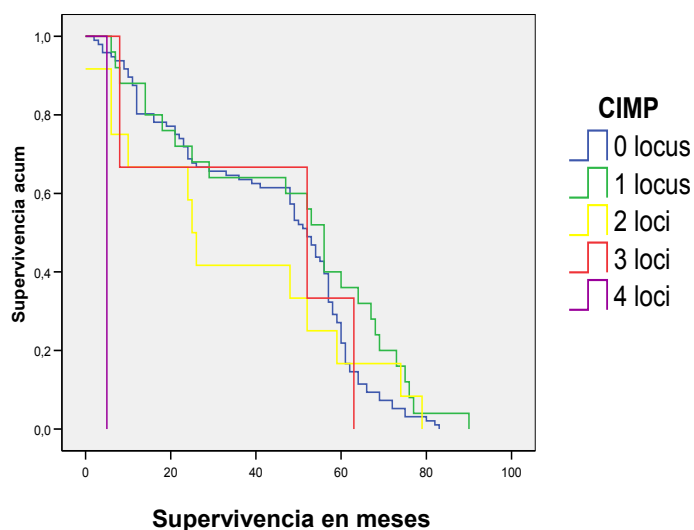
**Figura 58.** Comparación de las frecuencias de la metilación simultánea en los 5 marcadores analizados en función de MSI.

Por otra parte, cuando se realiza el análisis a loci metilados concretos observamos que los pacientes portadores de 2 o más loci metilados presentan metilación en uno de los genes del sistema MMR, especialmente en el gen *MLH1* (Figura 59).

MSI-H						MSI-L					
Tumor	MLH1	MSH2	P15	P16	CDH1	Tumor	MLH1	MSH2	P15	P16	CDH1
17						18					
38						19					
53						31					
65						34					
68						37					
70						40					
75						42					
108						47					
112						61					
125						64					
132						93					
136						101					
153						110					
170						147					
179						176					
190						187					
						193					

**Figura 59.** Patrón de metilación de los tumores MSI-L y MSI-H. Las columnas y las líneas corresponden a los marcadores y a los tumores analizados respectivamente. Los cuadros sombreados indican la presencia de metilación.

El análisis de la curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes en función de la presencia simultánea de varios loci metilados, demuestra que la supervivencia es menor en los pacientes con varios loci metilados, siendo la más baja la del paciente con los 4 loci metilados (log rank  $P < 0,001$ ; Figura 60).



**Figura 60.** Curva Kaplan-Meier de supervivencia de los pacientes en función de la presencia simultánea de varios loci metilados.

#### 4. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GEN *MLH1*

Se han analizado 3 polimorfismos localizados en 3 regiones codificantes del gen *MLH1*: 415G>C (rs28930073, en el exon 5); 655A>G (rs1799977, en el exon 8) y 1852-1853 AA>GC (en el exon 16) en 140 pacientes con cáncer colorrectal esporádico y 125 controles. La media de edad junto a las edades mínimas y máximas de los grupos de pacientes y controles está resumida en la Tabla 43.

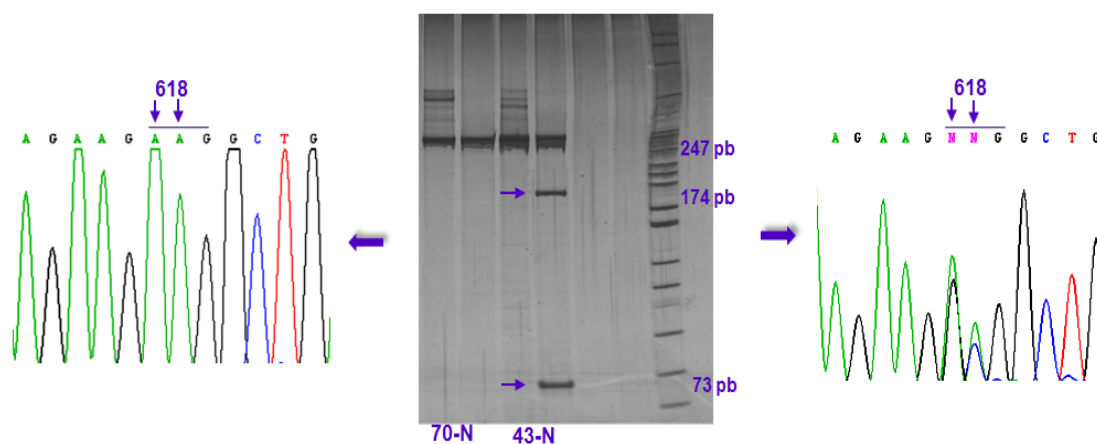
	Controles (125)	Pacientes (140)
Media de edad	65,82 ± 11,53	68,0 ± 12,82
Rango	32 - 90	16 - 93

**Tabla 43.** Media de edad de controles y pacientes.

#### POLIMORFISMOS G415C (*MLH1* D132H) Y A1852G/A1853C (*MLH1* K618A)

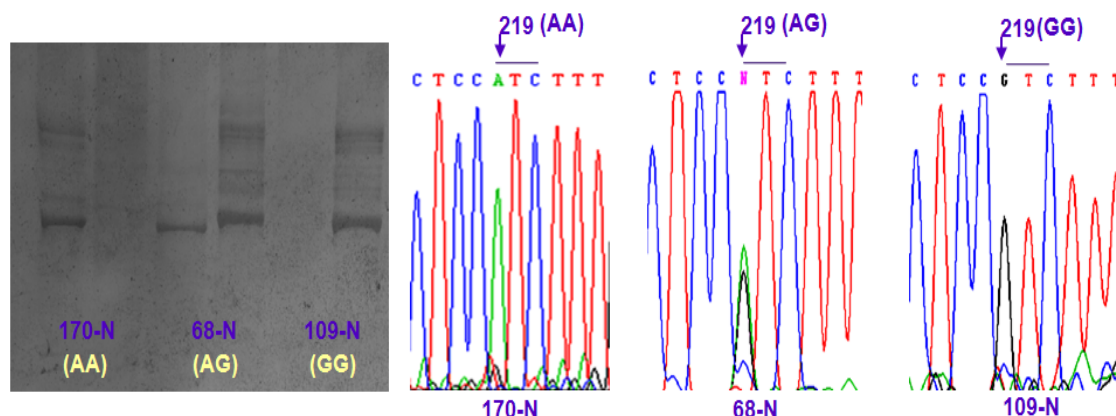
En nuestro estudio no hemos detectado ningún individuo portador del polimorfismo *MLH1* D132H ni en pacientes, ni en controles.

Por otra parte, la variante *MLH1* K618A se ha detectado únicamente en heterocigosis y con una frecuencia muy baja. Además, este polimorfismo es más frecuente en controles que en pacientes: 4% (5/125) frente a 0,71% (1/140) respectivamente. Este único caso, detectado en los pacientes, corresponde a un tumor estable. El escaso número de casos con esta variante no nos ha permitido realizar un análisis estadístico de la misma.



**Figura 61.** Análisis del polimorfismo *MLH1* A1852G/A1853C: Ejemplo de un gel de electroforesis y secuenciación mostrando un individuo normal a la izquierda (AAG en el codon 618) y un individuo heterocigoto a la derecha (A/G en la posición 1852 y A/C en la posición 1853). En el gel la enzima *Fnu4H1* genera dos fragmentos (174 pb y 73 pb) en el individuo 43.

## POLIMORFISMO A655G (*MLH1* I219V)



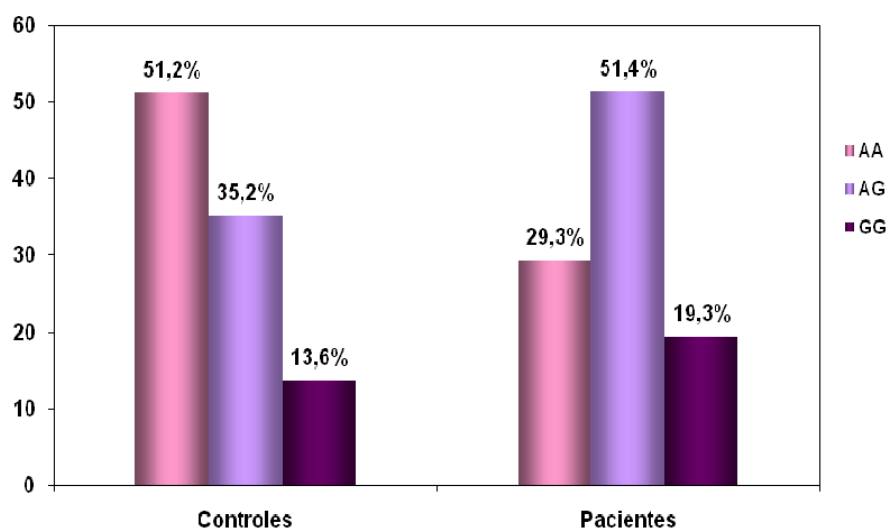
**Figura 62. Análisis del polimorfismo *MLH1* A655G:** Ejemplo de un gel de electroforesis y secuenciación de un individuo homocigoto normal (170; AA en la posición 655), un individuo heterocigoto (68; AG en la posición 655) y un individuo homocigoto polimórfico (109; GG en la posición 655).

Las frecuencias genotípicas y alélicas respectivas en pacientes y controles, así como los valores obtenidos en el análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg de esta variante están resumidos en la Tabla 44.

A655G (rs1799977)		Pacientes (140)	Controles (125)
Frecuencias genotípicas observadas	AA	41 (29,3%)	64 (51,2%)
	AG	72 (51,4%)	44 (35,2%)
	GG	27 (19,3%)	17 (13,6%)
Frecuencias alélicas	(A)	0,55	0,69
	(G)	0,45	0,31
Equilibrio de Hardy-Weinberg	p	SI (0,904)	SI (0,128)

**Tabla 44.** Frecuencias genotípicas y alélicas observadas en los controles y los pacientes.

El genotipo más frecuente en los controles es el homocigoto normal AA (51,2%), seguido por el heterocigoto AG (35,2%) y al final el homocigoto variante GG (13,6%) (Tabla 44, Figura 63), mientras que en los pacientes, el genotipo más frecuente es el heterocigoto AG (51,4%), seguido por el homocigoto normal AA (29,3%) y el homocigoto variante (19,3%) (Tabla 44; Figura 63). Por otra parte, el cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg reveló que ambos grupos, controles y pacientes, están en equilibrio para el polimorfismo estudiado.



**Figura 63.** Distribución de los genotipos de la variante A655G (*MLH1* I219V) en controles y pacientes.

### ANÁLISIS DEL RIESGO RELATIVO ASOCIADO A A655G (*MLH1* I219V)

Las Tablas 45 y 46 resumen la asociación de los genotipos de la variante estudiada con el riesgo relativo de cáncer colorrectal.

Genotipos	Casos (140)	Controles (125)	HR	95% IC	p
AA	41 (29,3%)	64 (51,2%)	1	Referencia	
AG	72 (51,4%)	44 (35,2%)	2,55	1,48 – 4,39	0,01
GG	27 (19,3%)	17 (13,6%)	2,48	1,20 – 5,11	0,01
AG + GG	99 (70,71%)	61 (48,8%)	2,53	1,53 – 4,20	<0,001

**Tabla 45.** Riesgo de CCR asociado al polimorfismo A655G (*MLH1* I219V).

Grupos	Casos (140)	Controles (125)	HR	95% IC	p
<b>Varones</b>					
AA	25 (31,3%)	42 (59,2%)	1	Referencia	
AG	40 (50%)	22 (31%)	3,05	1,49 – 6,26	0,002
GG	15 (18,8%)	7 (9,8%)	3,60	1,29 – 10,03	0,014
AG + GG	55 (68,8%)	29 (40,8%)	3,19	1,63 – 6,22	0,001
<b>Mujeres</b>					
AA	16 (26,7%)	22 (40,7%)	1	Referencia	
AG	32 (53,3%)	22 (40,7%)	2,00	0,86 – 4,64	0,11
GG	12 (20%)	10 (18,6%)	1,65	0,57 – 4,75	0,35
AG + GG	44 (73,3%)	32 (59,3%)	1,89	0,86 – 4,16	0,11

**Tabla 46.** Riesgo de CCR asociado al polimorfismo A655G (*MLH1* I219V) en mujeres y varones.

Los individuos portadores del alelo variante G (genotipo AG o GG) presentan más del doble de riesgo a desarrollar CCR en comparación con los homocigotos normales AA (HR: 2,53; 95% IC = 1,53-4,20;  $p < 0,001$ ; Tabla 45). Los heterocigotos AG y los homocigotos variantes GG presentan un riesgo más elevado de cáncer colorrectal en comparación con los homocigotos normales AA (HR: 2,55; 95% IC = 1,48-4,39;  $p = 0,01$ ; y HR: 2,48; 95% IC = 1,20-5,11;  $p = 0,01$  respectivamente; Tabla 45). Segmentando por sexos, observamos que los varones portadores del alelo variante G (pero no las mujeres) presentan el triple de riesgo a desarrollar CCR que los varones con el genotipo homocigoto normal AA (HR: 3,19; 95% IC = 1,63-6,22;  $p = 0,001$ ; HR: 3,05; 95% IC = 1,49-6,26;  $p = 0,002$ ; y HR: 3,60; 95% IC = 1,29-10,03;  $p = 0,014$  respectivamente, Tabla 46).

### **POLIMORFISMO A655G (*MLH1* I219V) Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS**

En la Tabla 47 se resume la relación entre el polimorfismo A655G y las características clinicopatológicas de los pacientes.

Veintidós de los 27 tumores homocigotos variantes GG (81,48%) tienen una localización distal ( $\chi^2 = 6,01$ ;  $p = 0,05$ ) y, en general, los tumores portadores del alelo variante G (AG+GG): 73,73% (73/99) presentan una localización en el colon distal ( $\chi^2 = 4,69$ ;  $p = 0,04$ ; Tabla 47). Los tumores con el alelo variante G no presentan recurrencia, metástasis o invasión vascular ( $\chi^2 = 6,72$ ;  $p = 0,01$ ;  $\chi^2 = 10,69$ ;  $p = 0,004$ ;  $\chi^2 = 4,73$ ;  $p = 0,03$  respectivamente, Tabla 47).



Variable	A655G ( <i>MLH1</i> I219V)						
	AA	AG	GG	p	AA	AG + GG	p
<b>Sexo</b>							
Varones	25 (31,3%)	40 (50%)	15 (18,8%)	ns	25 (31,3%)	55 (68,8%)	ns
Mujeres	16 (26,7%)	32 (53,3%)	12 (20%)		16 (26,7%)	44 (73,3%)	
<b>Media de edad</b>	65,9 ± 10,4	68,4 ± 13,9	66,1 ± 12,7	ns	65,9 ± 10,4	67,8 ± 13,6	ns
<b>Edad</b>							
≤50 años	4 (25%)	8 (50%)	4 (25%)	ns	4 (25%)	12 (75%)	ns
>50 años	37 (29,8%)	64 (51,6%)	23 (18,5%)		37 (29,8%)	87 (70,2%)	
<b>Localización</b>							
Derecha	4 (13,3%)	21 (70%)	5 (16,7%)	<b>0,05</b>	4 (13,3%)	26 (86,7%)	<b>0,04</b>
Izquierda	37(33,6%)	51 (46,4%)	22 (20%)		37 (33,6%)	73 (66,4)	
<b>Estadios de Dukes</b>							
A	3 (30%)	4 (40%)	3 (30%)	ns	3 (30%)	7 (70%)	ns
B	13 (24,1%)	34 (63%)	7 (13%)		13 (24,1%)	41 (75,9%)	
C	16 (30,8%)	23 (44,2%)	13 (25%)	ns	16 (30,8%)	36 (69,2%)	ns
D	9 (37,5%)	11 (45,8%)	4 (16,7%)		9 (37,5%)	15 (62,5%)	
A+B	16 (24,6%)	38 (60%)	10 (15,4%)		16 (24,6)	48 (75,4%)	
C+D	25 (33,3%)	34 (44%)	17 (22,7%)		25 (33,3%)	51 (66,7%)	
<b>Grado de diferenciación</b>							
Bien	14 (22,6%)	35 (56,5%)	13 (21%)	ns	14 (22,6%)	48 (77,4%)	ns
Moderado	21 (32,3%)	31 (47,7%)	13 (20%)		21 (32,3%)	44 (67,7%)	
Pobre	6 (46,2%)	6 (46,2%)	1 (7,7%)		6 (46,2%)	7 (53,8%)	
<b>Recurrencia</b>							
No	23 (22,8%)	58 (57,4%)	20 (19,8%)	<b>0,02</b>	23 (22,8%)	78 (77,2%)	<b>0,01</b>
Si	18 (46,2%)	14 (35,9%)	7 (17,9%)		18 (46,2%)	21 (53,8%)	
<b>Persistencia (metástasis)</b>							
No	19 (20,7%)	53 (57,6%)	20 (21,7%)	<b>0,008</b>	19 (20,7%)	73 (79,3%)	<b>0,004</b>
Si	22 (45,8%)	19 (39,6%)	7 (14,6%)		22 (45,8%)	26 (54,2%)	
<b>Invasión vascular</b>							
No	29 (25,4%)	65 (57%)	20 (17,5%)	<b>0,02</b>	29 (25,4%)	85 (74,6%)	<b>0,03</b>
Si	12 (46,2%)	7 (26,9%)	7 (26,9%)		12 (46,2%)	14 (53,8%)	
<b>Fenotipo mucosecretor</b>							
No	39 (32,5%)	58 (48,3%)	23 (19,2%)	ns	39 (32,5%)	81 (67,5%)	ns
Si	2 (18,2%)	7 (63,6%)	2 (18,2%)		2 (18,2%)	9 (81,8%)	
<b>Total</b>	41/140 (29,3%)	72/140 (51,4%)	27/140 (19,3%)		41/140 (29,3%)	99/140 (70,7%)	

En algunos casos no observamos un total de 41, 72 y 27 o 41 y 99 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 47.** Relación de las variantes de A655G (*MLH1* I219V) con las características clinicopatológicas de los tumores.

## POLIMORFISMO A655G (*MLH1* I219V) Y VARIABLES GENÉTICAS

Aunque el genotipo heterocigoto AG es el más frecuente en los tumores de los tres niveles de MSI, la asociación no resulta estadísticamente significativa ( $p = 0,17$ ; Tabla 48 y Figura 64). Un 94,1% (16/17) de los tumores MSI-L, un 68,8% (11/16) de los tumores MSI-H y un 67,3% (72/107) de los tumores MSS son portadores del alelo variante G, aunque la asociación tampoco alcanza la significación estadística ( $p = 0,07$ ; Tabla 48).

Variable	A655G ( <i>MLH1</i> I219V)						
	AA	AG	GG	p	AA	AG + GG	p
<b>MSI</b>							
MSS	35 (32,7%)	52 (48,6%)	20 (18,7%)	ns	35 (32,7%)	72 (67,3%)	0,07
MSI-L	1 (5,9%)	13 (76,5%)	3 (17,6%)		1 (5,9%)	16 (94,1%)	
MSI-H	5 (31,3%)	7 (43,8%)	4 (25%)		5 (31,3%)	11 (68,8%)	
<b>MSI</b>							
MSS+MSI-L	36 (29%)	65 (52,4%)	23 (18,5%)	ns	36 (29%)	88 (71%)	ns
MSI-H	5 (31,3%)	7 (43,8%)	4 (25%)		5 (31,3%)	11 (68,8%)	
<b>Mut <i>KRAS2</i></b>							
No	8 (16,3%)	31 (63,3%)	10 (20,4%)	ns	8 (16,3%)	41 (83,7%)	ns
Si	6 (23,1%)	15 (57,7%)	5 (19,2%)		6 (23,1%)	20 (76,9%)	
<b>LOH <i>TP53</i></b>							
No	31 (31,3%)	49 (49,5%)	19 (19,2%)	ns	31 (31,3%)	68 (68,7%)	ns
Si	7 (21,9%)	20 (62,5%)	5 (15,6%)		7 (21,9%)	25 (78,1%)	
<b>Mut <i>BAX</i></b>							
No	39 (29,1%)	69 (51,5%)	26 (19,4%)	ns	39 (29,1%)	95 (70,9%)	ns
Si	2 (33,3%)	3 (50%)	1 (16,7%)		2 (33,3%)	4 (66,7%)	
<b>Mut <i>TGFBR2</i></b>							
No	38 (30,2%)	65 (51,6%)	23 (18,3%)	ns	38 (30,2%)	88 (69,8%)	ns
Si	3 (21,4%)	7 (50%)	4 (28,6%)		3 (21,4%)	11 (78,6%)	
<b>LOH <i>APC</i></b>							
No	36 (29,5%)	62 (50,8%)	24 (19,7%)	ns	36 (29,5%)	86 (70,5%)	ns
Si	4 (25%)	9 (56,3%)	3 (18,8%)		4 (25%)	12 (75%)	
<b>LOH <i>DCC</i></b>							
No	29 (28,7%)	53 (52,5%)	19 (18,8%)	ns	29 (28,7%)	72 (71,3%)	ns
Si	7 (24,1%)	16 (55,2%)	6 (20,7%)		7 (24,1%)	22 (75,9%)	
<b>LOH <i>MLH1</i></b>							
No	15 (21,4%)	42 (60%)	13 (18,6%)	ns	15 (21,4%)	55 (78,6%)	ns
Si	0 (0%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)		0 (0%)	7 (100%)	
<b>LOH <i>MSH2</i></b>							
No	37 (31,1%)	57 (47,9%)	25 (21%)	ns	37 (31,1%)	82 (68,9%)	ns
Si	2 (11,8%)	13 (76,5%)	2 (11,8%)		2 (11,8%)	15 (88,2%)	
<b>Total</b>	41/140 (29,3%)	72/140 (51,4%)	27/140 (19,3%)		41/140 (29,3%)	99/140 (70,7%)	

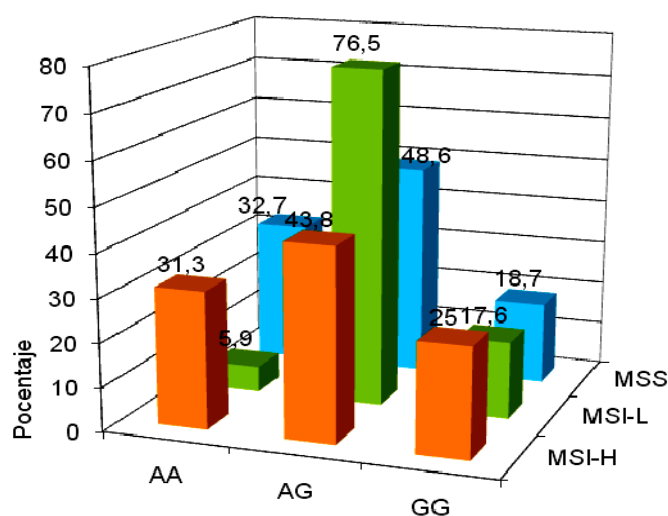
En algunos casos no observamos un total de 41, 72 y 27 o 41 y 99 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 48.** Relación de las variantes de A655G (*MLH1* I219V) con las variables genéticas de los tumores.

Variable	A655G ( <i>MLH1</i> I219V)						
	AA	AG	GG	p	AA	AG + GG	p
<b>Met <i>MLH1</i></b>							
No	35 (31%)	55 (48,7%)	23 (20,4%)	ns	35 (31%)	78 (69%)	ns
Si	6 (22,2%)	17 (63%)	4 (14,8%)		6 (22,2%)	21 (77,8%)	
<b>Met <i>MSH2</i></b>							
No	38 (30,6%)	62 (50%)	24 (19,4%)	ns	38 (30,6%)	86 (69,4%)	ns
Si	3 (18,8%)	10 (62,5%)	3 (18,8%)		3 (18,8%)	13 (81,3%)	
<b>Met <i>P15</i></b>							
No	40 (29,4%)	69 (50,7%)	27 (19,9%)	ns	40 (29,4%)	96 (70,6%)	ns
Si	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)		1 (25%)	3 (75%)	
<b>Met <i>P16</i></b>							
No	37 (29,1%)	65 (51,2%)	25 (19,7%)	ns	37 (29,1%)	90 (70,9%)	ns
Si	4 (30,8%)	7 (53,8%)	2 (15,4%)		4 (30,8%)	9 (69,2%)	
<b>Met <i>CDH1</i></b>							
No	40 (29,2%)	70 (51,1%)	27 (19,7%)	ns	40 (29,2%)	97 (70,8%)	ns
Si	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0 (0%)		1 (33,3%)	2 (66,7%)	
<b>Total</b>	41/140 (29,3%)	72/140 (51,4%)	27/140 (19,3%)		41/140 (29,3%)	99/140 (70,7%)	

En algunos casos no observamos un total de 41, 72 y 27 o 41 y 99 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 48 (Cont).**



**Figura 64.** Distribución de los tumores con el polimorfismo A655G (*MLH1* I219V) en función del nivel de MSI del tumor.

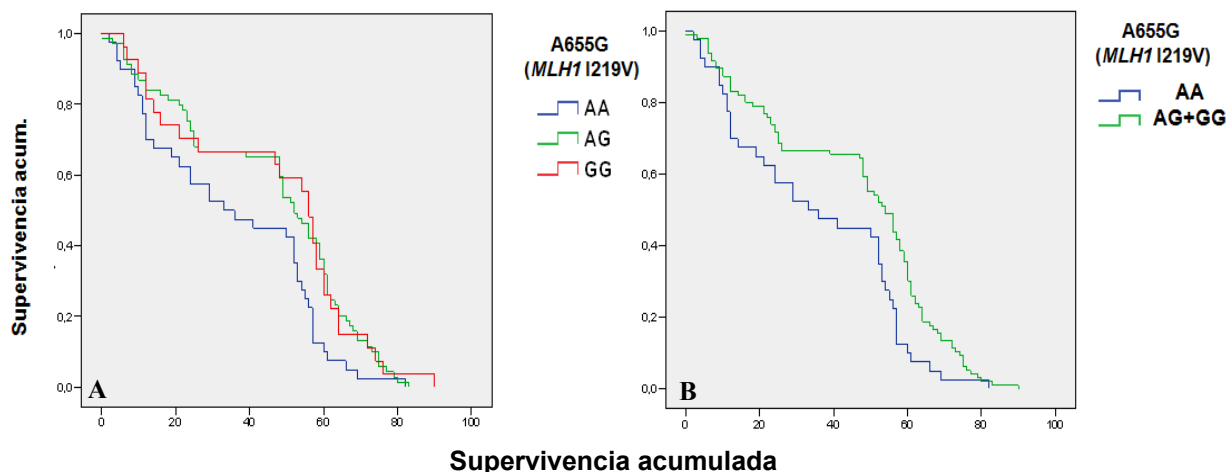
### POLIMORFISMO A655G (*MLH1* I219V) Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

Los portadores del genotipo homocigoto variante GG del polimorfismo A655G presentan una media de supervivencia más alta que los portadores del genotipo homocigoto normal AA, y casi igual a la del grupo de los pacientes heterocigotos AG ( $p = 0,05$ , Tabla 49 y log rank  $P = 0,026$ ; Figura 65A). Así, tomados en conjunto, los portadores del alelo variante G presentan una

media de supervivencia más alta que los homocigotos normales AA ( $p = 0,01$ , Tabla 49; log rank  $P = 0,007$ ; Figura 65B).

Genotipo	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
AA (40)	35,35 $\pm$ 3,61	19/40 (47,5%)	4/40 (10%)
AG (69)	45,61 $\pm$ 23,7	46/69 (66,67%)	26/69 (37,68%)
GG (27)	45,81 $\pm$ 24,8	18/27 (66,67%)	8/27 (29,63%)
AG+GG (96)	45,67 $\pm$ 2,44	63/96 (65,6%)	29/96 (30,2%)

**Tabla 49.** Supervivencia media de los pacientes en función de las variantes del polimorfismo A655G (*MLH1* I219V).



**Figura 65 A y B.** Curvas Kaplan-Meier de supervivencia de los pacientes en función del polimorfismo A655G (*MLH1* I219V).

### POLIMORFISMO A655G (*MLH1* I219V) Y VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS EN FUNCIÓN DE MSI

Todos los tumores MSI-L y el 55,6% (10/18) de los tumores MSS en el estadio D de Dukes son portadores del alelo variante G, aunque esta asociación no alcanza la significación estadística ( $\chi^2 = 5,03$ ;  $p = 0,08$ ). La misma tendencia se observa al reunir los tumores en estadios A+B y C+D: todos los tumores MSI-L y el 63,9% (39/61) de los tumores MSS en estadios más tardíos C+D portan el alelo variante G ( $\chi^2 = 4,95$ ;  $p = 0,08$ ; Tabla 50). Los tumores MSS moderadamente diferenciados presentan frecuentemente el genotipo heterocigoto AG o el homocigoto normal AA (40,4% y 36,5% respectivamente), mientras que todos los tumores MSI-L moderadamente diferenciados presentan el genotipo AG ( $\chi^2 = 10,04$ ;  $p = 0,04$ ). Los tumores MSS bien diferenciados presentan el genotipo AG y AA (58,3% y 25% respectivamente), aunque tal asociación no es estadísticamente significativa ( $p = 0,3$ ; Tabla 50). Todos los tumores MSI-L con el alelo variante G presentan metástasis ( $\chi^2 = 6,57$ ;  $p = 0,04$ ), y todos los tumores MSS y MSI-L

con el alelo variante G presentan el fenotipo mucosecretor ( $\chi^2 = 6,51$ ;  $p = 0,04$ ; Tabla 50). No se observan asociaciones con las restantes variables de la Tabla 50.

Variable		A655G ( <i>MLH1</i> I219V)							
		MSI	AA	AG	GG	p	AA	AG + GG	p
Sexo									
Varones	MSS	21 (33,3%)	31 (49,2%)	11 (17,5%)	ns	21 (33,3%)	42 (66,7%)	ns	
		MSI-L	1 (12,5%)	6 (75%)		1 (12,5%)	1 (12,5%)		7 (87,5%)
		MSI-H	3 (33,3%)	3 (33,3%)		3 (33,3%)	3 (33,3%)		6 (66,7%)
	Mujeres	MSS	14 (31,8%)	21 (47,7%)	9 (20,5%)	ns	14 (31,8%)	30 (68,2%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	7 (77,8)	2 (22,2%)		0 (0%)	9 (100%)	
		MSI-H	2 (28,6%)	4 (57,1%)	1 (14,3%)		2 (28,6%)	5 (71,4%)	
Media de edad									
	MSS	65,5 ± 10,4	68,1 ± 12,7	69 ± 9,9	ns	65,5 ± 10,4	68,3 ± 12,0	ns	
	MSI-L	57 (1 caso)	64,9 ± 17,9	71,7 ± 11,9	ns	57 (1 caso)	66,2 ± 16,8	ns	
	MSI-H	70,6 ± 10,5	77,7 ± 12,4	47,3 ± 11,2	0,004	70,6 ± 10,5	66,6 ± 19,1	ns	
Edad									
≤50 años	MSS	4 (36,4%)	6 (54,5%)	1 (9,1%)	0,01	4 (36,4%)	7 (63,6%)	ns	
		MSI-L	0 (0%)	2 (100%)		0 (0%)	2 (100%)		
		MSI-H	0 (0%)	0 (0%)		3 (100%)	0 (0%)		3 (100%)
	>50 años	MSS	31 (32,3%)	46 (47,9%)	19 (19,8%)	ns	31 (32,3%)	65 (67,7%)	ns
		MSI-L	1 (6,7%)	11 (73,3%)	3 (20%)		1 (6,7%)	14 (93,3%)	
		MSI-H	5 (38,5%)	7 (53,8%)	1 (7,7%)		5 (38,5%)	8 (61,5%)	
Localización									
Derecha	MSS	2 (14,3%)	11 (78,6%)	1 (7,1%)	ns	2 (14,3%)	12 (85,7%)	ns	
		MSI-L	0 (0%)	4 (66,7%)		2 (33,3%)	0 (0%)		6 (100%)
		MSI-H	2 (20%)	6 (60%)		2 (20%)	2 (20%)		8 (80%)
	Izquierda	MSS	33 (35,5%)	41 (44,1%)	19 (20,4%)	ns	33 (35,5%)	60 (64,5%)	ns
		MSI-L	1 (9,1%)	9 (81,8%)	1 (9,1%)		1 (9,1%)	10 (90,9%)	
		MSI-H	3 (50%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)		3 (50%)	3 (50%)	
Estadios de Dukes									
A	MSS	3 (30%)	4 (40%)	3 (30%)	--	3 (30%)	7 (70%)	--	
		MSI-L	--	--		--	--		--
		MSI-H	--	--		--	--		--
	B	MSS	10 (28,6%)	21 (60%)	4 (11,4%)	ns	10 (28,6%)	25 (71,4%)	ns
		MSI-L	1 (11,1%)	7 (77,8%)	1 (11,1%)		1 (11,1%)	8 (88,9%)	
		MSI-H	2 (20%)	6 (60%)	2 (20%)		2 (20%)	8 (80%)	
C	MSS	14 (31,8%)	20 (45,5%)	10 (22,7%)	ns	14 (31,8%)	30 (68,2%)	ns	
	MSI-L	0 (0%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)		0 (0%)	3 (100%)		
	MSI-H	2 (40%)	1 (20%)	2 (40%)		2 (40%)	3 (60%)		
D	MSS	8 (44,4%)	7 (38,9%)	3 (16,7%)	ns	8 (44,4%)	10 (55,6%)	0,08	
	MSI-L	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)		0 (0%)	5 (100%)		
	MSI-H	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (100%)	0 (0%)		
A+B	MSS	13 (28,3%)	26 (56,5%)	7 (15,2%)	ns	13 (28,3%)	33 (71,7%)	ns	
	MSI-L	1 (11,1%)	7 (77,8%)	1 (11,1%)		1 (11,1%)	8 (88,9%)		
	MSI-H	2 (20%)	6 (60%)	2 (20%)		2 (20%)	8 (80%)		
C+D	MSS	22 (36,1%)	26 (42,6%)	13 (21,3%)	ns	22 (36,1%)	39 (63,9%)	0,08	
	MSI-L	0 (0%)	6 (75%)	2 (25%)		0 (0%)	8 (100%)		
	MSI-H	3 (50%)	1 (16,7%)	2 (33,3%)		3 (50%)	3 (50%)		
Total			41/140 (29,3%)	72/140 (51,4%)	27/140 (19,3%)		41 /140 (29,3%)	99/140 (70,7%)	

En algunos casos no observamos un total de 41, 72 y 27 o 41 y 99 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 50.** Relación de las variantes de A655G (*MLH1* I219V) con las variables clinicopatológicas en función del nivel de MSI de los tumores.

		A655G ( <i>MLH1</i> I219V)							
Variable		MSI	AA	AG	GG	p	AA	AG + GG	p
Grado de diferenciación									
Bien	MSS	12 (25%)	28 (58,3%)	8 (16,7%)	ns	12 (25%)	36 (75%)	ns	
	MSI-L	0 (0%)	5 (62,5%)	3 (37,5%)		0 (0%)	8 (100%)		
	MSI-H	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)		2 (33,3%)	4 (66,7%)		
Moderado	MSS	19 (36,5%)	21 (40,4%)	12 (23,1%)	0,04	19 (36,5%)	33 (63,5%)	ns	
	MSI-L	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)		0 (0%)	8 (100%)		
	MSI-H	2 (40%)	2 (40%)	1 (20%)		2 (40%)	3 (60%)		
Pobre	MSS	4 (57,1%)	3 (42,9%)	0 (0%)	ns	4 (57,1%)	3 (42,9%)	ns	
	MSI-L	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (100%)	0 (0%)		
	MSI-H	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)		1 (20%)	4 (80%)		
Recurrencia									
No	MSS	20 (27,4%)	40 (54,8%)	13 (17,8%)	ns	20 (27,4%)	53 (72,6%)	ns	
	MSI-L	1 (5,9%)	13 (76,5%)	3 (17,6%)		1 (5,9%)	16 (94,1%)		
	MSI-H	2 (18,2%)	5 (45,5%)	4 (36,4%)		2 (18,2%)	9 (81,8%)		
Si	MSS	9 (45%)	7 (35%)	4 (20%)	ns	9 (45%)	11 (55%)	ns	
	MSI-L	--	--	--		--	--		
	MSI-H	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)		1 (50%)	1 (50%)		
Persistencia (metástasis)									
No	MSS	17 (24,3%)	39 (55,7%)	14 (20%)	ns	17 (24,3%)	53 (75,7%)	ns	
	MSI-L	1 (10%)	7 (70%)	2 (20%)		1 (10%)	9 (90%)		
	MSI-H	1 (10%)	5 (50%)	4 (40%)		1 (10%)	9 (90%)		
Si	MSS	12 (54,5%)	7 (31,8%)	3 (13,6%)	ns	12 (54,5%)	10 (45,5%)	0,04	
	MSI-L	0 (0%)	6 (85,7%)	1 (14,3%)		0 (0%)	7 (100%)		
	MSI-H	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)		2 (50%)	2 (50%)		
Invasión vascular									
No	MSS	28 (31,8%)	44 (50%)	16 (18,2%)	ns	28 (31,8%)	60 (68,2%)	ns	
	MSI-L	1 (7,7%)	11 (84,6%)	1 (7,7%)		1 (7,7%)	12 (92,3%)		
	MSI-H	3 (25%)	7 (58,3%)	2 (16,7%)		3 (25%)	9 (75%)		
Si	MSS	7 (43,8%)	5 (31,3%)	4 (25%)	ns	7 (43,8%)	9 (56,3%)	ns	
	MSI-L	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)		0 (0%)	1 (100%)		
	MSI-H	2 (66,7%)	0 (0%)	1 (33,3%)		2 (66,7%)	1 (33,3%)		
Fenotipo mucosecretor									
No	MSS	35 (36,1%)	43 (44,3%)	19 (19,6%)	ns	35 (36,1%)	62 (63,9%)	ns	
	MSI-L	1 (9,1%)	9 (81,8%)	1 (9,1%)		1 (9,1%)	10 (90,9%)		
	MSI-H	3 (25%)	6 (50%)	3 (25%)		3 (25%)	9 (75%)		
Si	MSS	0 (0%)	5 (83,3%)	1 (16,7%)	ns	0 (0%)	6 (100%)	0,04	
	MSI-L	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)		0 (0%)	2 (100%)		
	MSI-H	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0 (0%)		2 (66,7%)	1 (33,3%)		
Total		41/140 (29,3%)	72/140 (51,4%)	27/140 (19,3%)		41/140 (29,3%)	99/140 (70,7%)		

En algunos casos no observamos un total de 41, 72 y 27 o 41 y 99 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 50 (Cont).**

## **POLIMORFISMO A655G (*MLH1* I219V) Y VARIABLES GENÉTICAS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE MSI**

Los tumores MSS y MSI-L con el alelo variante G no presentan mutaciones en el gen *TGFBR2* ( $\chi^2 = 6,93$ ;  $p = 0,03$ ); mientras que los tumores MSI-H portadores del mismo alelo presentan frecuentemente esta alteración, aunque esta asociación no es estadísticamente significativa ( $p = 0,2$ ; Tabla 51). Los tumores MSS y MSI-L con el genotipo heterocigoto AG no presentan metilación en el gen *MLH1* ( $\chi^2 = 9,45$ ;  $p = 0,05$ ), aunque cuando se analizan los portadores de la variante G (AG+GG) la significación estadística desaparece ( $p = 0,08$ ; Tabla 51).

Los tumores con diferentes niveles de MSI con el alelo variante G no presentan metilación en el gen *P15*, ni en el gen *P16* ( $\chi^2 = 7,55$ ;  $p = 0,02$  y  $\chi^2 = 5,45$ ;  $p = 0,07$  respectivamente; Tabla 51).

		A655G ( <i>MLH1</i> I219V)							
Variable		MSI	AA	AG	GG	p	AA	AG + GG	p
Mut <i>KRAS2</i>									
	No	MSS	7 (19,4%)	24 (66,7%)	5 (13,9%)	ns	7 (19,4%)	29 (80,6%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	5 (71,4)	2 (28,6%)		0 (0%)	7 (100%)	
		MSI-H	1 (16,7%)	2 (33,3%)	3 (50%)		1 (16,7%)	5 (83,3%)	
	Si	MSS	5 (25%)	10 (50%)	5 (25%)	ns	5 (25%)	15 (75%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	5 (100%)	0 (0%)		0 (0%)	5 (100%)	
		MSI-H	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)		1 (100%)	0 (0%)	
LOH <i>TP53</i>									
	No	MSS	25 (33,8%)	35 (47,3%)	14 (18,9%)	ns	25 (33,8%)	49 (66,2%)	ns
		MSI-L	1 (8,3%)	9 (75%)	2 (16,7%)		1 (8,3%)	11 (91,7%)	
		MSI-H	5 (38,5%)	5 (38,5%)	3 (23,1%)		5 (38,5%)	8 (61,5%)	
	Si	MSS	7 (29,2%)	14 (58,3%)	3 (12,5%)	ns	7 (29,2%)	17 (70,8%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)		0 (0%)	5 (100%)	
		MSI-H	0 (0%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)		0 (0%)	3 (100%)	
Mut <i>BAX</i>									
	No	MSS	34 (32,7%)	51 (49%)	19 (18,3%)	ns	34 (32,7%)	70 (67,3%)	ns
		MSI-L	1 (5,9%)	13 (76,5%)	3 (17,6%)		1 (5,9%)	16 (94,1%)	
		MSI-H	4 (30,8%)	5 (38,5%)	4 (30,8%)		4 (30,8%)	9 (69,2%)	
	Si	MSS	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	ns	1 (33,3%)	2 (66,7%)	ns
		MSI-L	--	--	--		--	--	
		MSI-H	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0 (0%)		1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Mut <i>TGFBR2</i>									
	No	MSS	33 (32%)	51 (49,5%)	19 (18,4%)	0,04	33 (32%)	70 (68%)	0,03
		MSI-L	1 (6,2%)	13 (81,2%)	2 (12,5%)		1 (6,2%)	15 (93,8%)	
		MSI-H	4 (57,1%)	1 (14,3%)	2 (28,6%)		4 (57,1%)	3 (42,9%)	
	Si	MSS	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)	ns	2 (50%)	2 (50%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)		0 (0%)	1 (100%)	
		MSI-H	1 (11,1%)	6 (66,7%)	2 (22,2%)		1 (11,1%)	8 (88,9%)	
LOH <i>APC</i>									
	No	MSS	31 (32%)	48 (49,5%)	18 (18,6%)	ns	31 (32%)	66 (68%)	ns
		MSI-L	1 (6,7%)	11 (73,3%)	3 (20%)		1 (6,7%)	14 (93,3%)	
		MSI-H	4 (40%)	3 (30%)	3 (30%)		4 (40%)	6 (60%)	
	Si	MSS	3 (33,3%)	4 (44,4%)	2 (22,2%)	ns	3 (33,3%)	6 (66,7%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)		0 (0%)	2 (100%)	
		MSI-H	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)		1 (20%)	4 (80%)	
LOH <i>DCC</i>									
	No	MSS	24 (30,8%)	39 (50%)	15 (19,2%)	ns	24 (30,8%)	54 (69,2%)	ns
		MSI-L	1 (7,7%)	10 (76,9%)	2 (15,4%)		1 (7,7%)	12 (92,3%)	
		MSI-H	4 (40%)	4 (40%)	2 (20%)		4 (40%)	6 (60%)	
	Si	MSS	6 (30%)	11 (55%)	3 (15%)	ns	6 (30%)	14 (70%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	3 (75%)	1 (25%)		0 (0%)	4 (100%)	
		MSI-H	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)		1 (20%)	4 (80%)	
LOH <i>MLH1</i>									
	No	MSS	13 (25,5%)	30 (58,8%)	8 (15,7%)	ns	13 (25,5%)	38 (74,5%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	9 (81,8%)	2 (18,2%)		0 (0%)	11 (100%)	
		MSI-H	2 (25%)	3 (37,5%)	3 (37,5%)		2 (25%)	6 (75%)	
	Si	MSS	--	4 (66,7%)	2 (33,3%)	ns	--	6 (100%)	--
		MSI-L	--	1 (100%)	0 (0%)		--	1 (100%)	
		MSI-H	--	--	--		--	--	
Total			41/140 (29,3%)	72/140 (51,4%)	27/140 (19,3%)		41 /140 (29,3%)	99/140 (70,7%)	

En algunos casos no observamos un total de 41, 72 y 27 o 41 y 99 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 51.** Relación de las variantes de A655G (*MLH1* I219V) con las variables genéticas en función del nivel de MSI de los tumores.

		A655G ( <i>MLH1</i> I219V)							
Variable		MSI	AA	AG	GG	p	AA	AG + GG	p
LOH <i>MSH2</i>									
No	MSS	MSS	32 (33,3%)	44 (45,8%)	20 (20,8%)	ns	32 (33,3%)	64 (66,7%)	ns
		MSI-L	1 (7,7%)	9 (69,2%)	3 (23,1%)		1 (7,7%)	12 (92,3%)	
		MSI-H	4 (40%)	4 (40%)	2 (20%)		4 (40%)	6 (60%)	
	Si	MSS	1 (12,5%)	7 (87,5%)	0 (0%)	ns	1 (12,5%)	7 (87,5%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	3 (100%)	0 (0%)		0 (0%)	3 (100%)	
		MSI-H	1 (16,7%)	3 (50%)	2 (33,3%)		1 (16,7%)	5 (83,3%)	
Met <i>MLH1</i>									
No	MSS	MSS	33 (34%)	46 (47,4%)	18 (18,6%)	0,05	33 (34%)	64 (66%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	8 (80%)	2 (20%)		0 (0%)	10 (100%)	
		MSI-H	2 (33,3%)	1 (16,7%)	3 (50%)		2 (33,3%)	4 (66,7%)	
	Si	MSS	2 (20%)	6 (60%)	2 (20%)	ns	2 (20%)	8 (80%)	ns
		MSI-L	1 (14,3%)	5 (71,4%)	1 (14,3%)		1 (14,3%)	6 (85,7%)	
		MSI-H	3 (30%)	6 (60%)	1 (10%)		3 (30%)	7 (70%)	
Met <i>MSH2</i>									
No	MSS	MSS	34 (32,4%)	52 (49,5%)	19 (18,1%)	ns	34 (32,4%)	71 (67,6%)	ns
		MSI-L	1 (9,1%)	7 (63,6%)	3 (27,3%)		1 (9,1%)	10 (90,9%)	
		MSI-H	3 (37,5%)	3 (37,5%)	2 (25%)		3 (37,5%)	5 (62,5%)	
	Si	MSS	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	ns	1 (50%)	1 (50%)	ns
		MSI-L	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)		0 (0%)	6 (100%)	
		MSI-H	2 (25%)	4 (50%)	2 (25%)		2 (25%)	6 (75%)	
Met <i>P15</i>									
No	MSS	MSS	35 (33,3%)	50 (47,6%)	20 (19%)	0,05	35 (33,3%)	70 (66,7%)	0,02
		MSI-L	0 (0%)	13 (81,2%)	3 (18,8%)		0 (0%)	16 (100%)	
		MSI-H	5 (33,3%)	6 (40%)	4 (26,7%)		5 (33,3%)	10 (66,7%)	
	Si	MSS	0 (0%)	2 (100%)	--	ns	0 (0%)	2 (100%)	ns
		MSI-L	1 (100%)	0 (0%)	--		1 (100%)	0 (0%)	
		MSI-H	0 (0%)	1 (100%)	--		0 (0%)	1 (100%)	
Met <i>P16</i>									
No	MSS	MSS	34 (32,1%)	52 (49,1%)	20 (18,9%)	ns	34 (32,1%)	72 (67,9%)	0,07
		MSI-L	0 (0%)	10 (83,3%)	2 (16,7%)		0 (0%)	12 (100%)	
		MSI-H	3 (33,3%)	3 (33,3%)	3 (33,3%)		3 (33,3%)	6 (66,7%)	
	Si	MSS	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	ns	1 (100%)	0 (0%)	ns
		MSI-L	1 (20%)	3 (60%)	1 (20%)		1 (20%)	4 (80%)	
		MSI-H	2 (28,6%)	4 (57,1%)	1 (14,3%)		2 (28,6%)	5 (71,4%)	
Met <i>CDH1</i>									
No	MSS	MSS	35 (32,7%)	52 (48,6%)	20 (18,7%)	ns	35 (32,7%)	72 (67,3%)	ns
		MSI-L	1 (6,7%)	11 (73,3%)	3 (20%)		1 (6,7%)	14 (93,3%)	
		MSI-H	4 (26,7%)	7 (46,7%)	4 (26,7%)		4 (26,7%)	11 (73,3%)	
	Si	MSS	--	--	--	ns	--	--	ns
		MSI-L	0 (0%)	2 (100%)	--		0 (0%)	2 (100%)	
		MSI-H	1 (100%)	0 (0%)	--		1 (100%)	0 (0%)	
Total			41/140 (29,3%)	72/140 (51,4%)	27/140 (19,3%)		41 /140 (29,3%)	99/140 (70,7%)	

En algunos casos no observamos un total de 41, 72 y 27 o 41 y 99 casos por la existencia de casos perdidos.

**Tabla 51 (Cont).**

## **POLIMORFISMO A655G (*MLH1* I219V) Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES EN FUNCIÓN DE MSI**

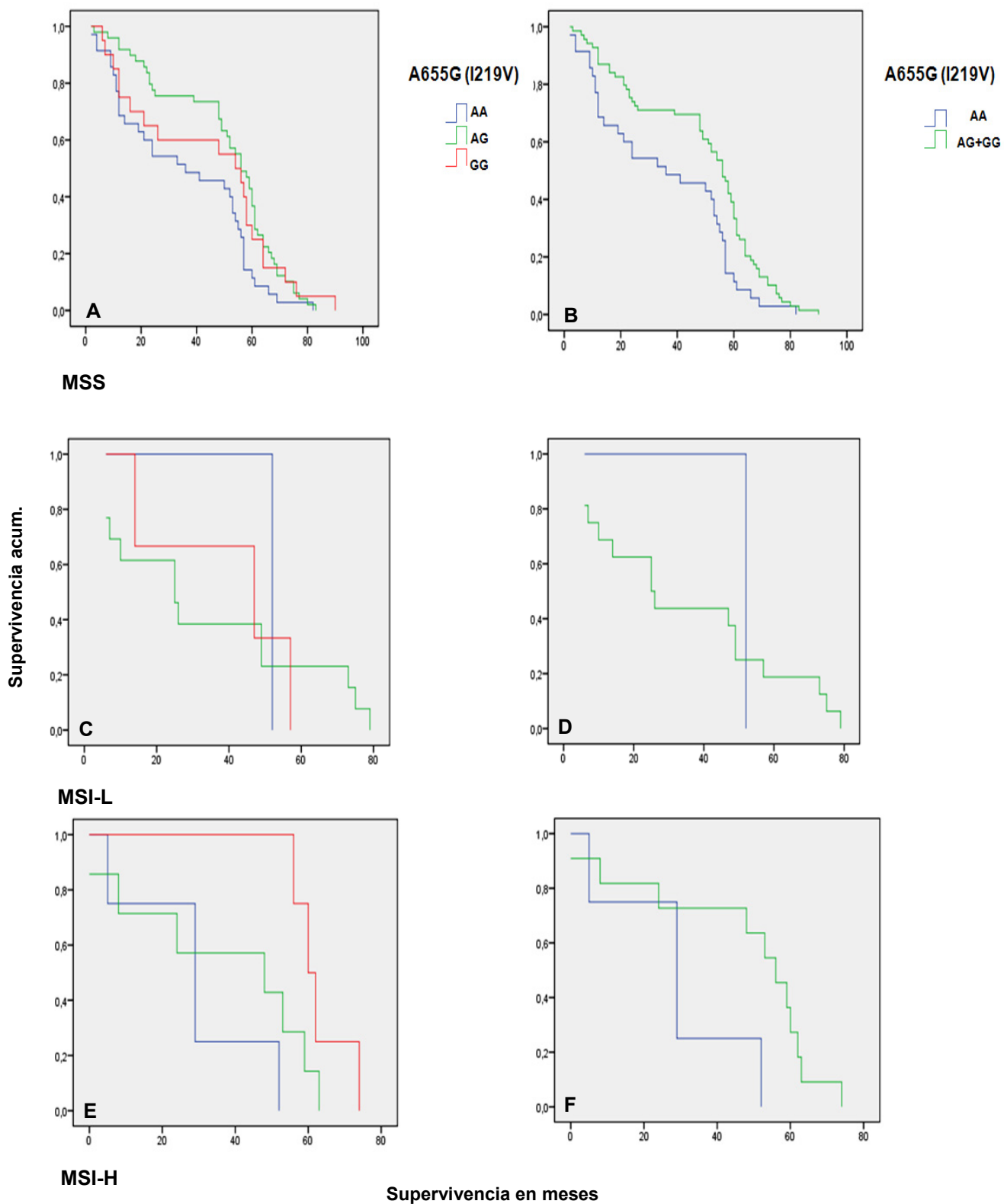
En pacientes con tumores MSS, se observa que los portadores del genotipo heterocigoto AG presentan la mejor supervivencia ( $50,1 \pm 21,1$  meses) seguidos por los portadores del genotipo homocigoto variante GG ( $43,3 \pm 26,6$  meses) y por los homocigotos normales AA con una media de  $35,6 \pm 23,5$  meses ( $p = 0,02$ ). Los portadores de la variante G (AG+GG) presentan mayor supervivencia que los portadores del alelo normal A ( $48,1 \pm 22,8$  meses vs.  $35,6 \pm 23,5$  meses;  $p = 0,01$ ; Tabla 52; log rank  $P = 0,023$  y log rank  $P = 0,006$  respectivamente; Figura 66 A y B). En los pacientes con tumores MSI-H, los portadores del genotipo homocigoto variante GG presentan mayor supervivencia que los heterocigotos AG y que los homocigotos normales AA



(63,0 ± 7,7 meses vs. 36,4 ± 25,5 meses y 26,8 ± 17,1 meses respectivamente; p = 0,05; Tabla 52 y log rank P = 0,05; Figura 66 E). Sin embargo, cuando reunimos los portadores de la variante G (AG+GG) se pierde la significación estadística (p = 0,1), aunque los portadores del alelo variante G presentan mayor supervivencia que los portadores del alelo normal A (46,1 ± 24,2 meses vs. 26,8 ± 17,1 meses; Tabla 52). La curva de supervivencia de Kaplan-Meier muestra en este caso también una tendencia a una mayor supervivencia en los portadores del alelo variante G (log rank P = 0,06; Figura 66 F). En los tumores MSI-L no observamos diferencias estadísticamente significativas.

MSI	Genotipo	Media de supervivencia global (meses)	Supervivencia a los 3 años (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
MSS	AA (35)	35,6 ± 23,5	17/35 (48,57%)	4/35 (11,43%)
	AG (52)	50,1 ± 21,1	37/52 (71,15%)	20/52 (38,46%)
	GG (20)	43,3 ± 26,6	12/20 (60%)	5/20 (25%)
	AG+GG (72)	48,1 ± 22,8	49/72 (68,1%)	23/72 (31,94%)
MSI-L	AA (1)	52 (1 caso)	1/1 (100%)	--
	AG (13)	33,5 ± 28,2	5/13 (38,46%)	3/13 (23,07%)
	GG (3)	39,3 ± 22,5	2/3 (66,7%)	0/3 (0%)
	AG+GG (16)	34,6 ± 26,6	7/16 (43,75%)	3/16 (18,75%)
MSI-H	AA (5)	26,8 ± 17,1	1/5 (20%)	0/5 (0%)
	AG (7)	36,4 ± 25,5	4/7 (57,14%)	1/7 (14,28%)
	GG (4)	63,0 ± 7,7	4/4 (100%)	2/4 (50%)
	AG+GG (11)	46,1 ± 24,2	8/11 (72,72%)	3/11 (27,27%)

**Tabla 52.** Supervivencia media de los pacientes en función de las variantes del polimorfismo A655G (*MLH1* I219V) dentro de los grupos MSI.



**Figura 66 A, B, C, D, E y F.** Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia de los pacientes en función del polimorfismo A655G (*MLH1* I219V) en los tumores con diferentes niveles MSI.

## *DISCUSIÓN*



## DISCUSIÓN

El cáncer es el resultado de un proceso evolutivo durante el cual el fenotipo de la célula normal se va alterando gradualmente como consecuencia de una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, hasta adquirir un fenotipo maligno y llegar a la metástasis (Hanahan *et al.*, 2000). Una de las neoplasias donde mejor se han podido analizar estas alteraciones es el cáncer colorrectal (Fearon *et al.*, 1990a; Tomlinson *et al.*, 1996a; Kinzler *et al.*, 1996; Vogelstein *et al.*, 2004; Bodmer, 2006). Este último constituye la afección más común del tubo digestivo y una de las patologías más frecuentes en los países industrializados, además de una de las enfermedades mejor conocidas y estudiadas. A pesar de ello, el CCR se sigue diagnosticando, generalmente, en unos estadios bastante avanzados por la falta de procedimientos que permiten su detección precoz.

Por otra parte, el CCR es una patología compleja y muy heterogénea, implicando varias vías de desarrollo, varios mecanismos de alteración y donde intervienen a la vez componentes hereditarios y ambientales, haciendo que el riesgo de padecer esta enfermedad sea altamente variable de una persona a otra.

Hasta el momento se han descrito dos grandes rutas de carcinogénesis en el CCR: la supresora y la mutadora. La vía mutadora ha sido propuesta como una vía alternativa de tumorigénesis a la vía supresora (Thibodeau *et al.*, 1993; Aaltonen *et al.*, 1993; Ionov *et al.*, 1993), caracterizada por la alteración de los genes de la estabilidad MMR, y por la aparición de la inestabilidad MSI. En este estudio, hemos analizado las principales alteraciones implicadas en la carcinogénesis colorrectal desarrollada a través la vía mutadora, intentando determinar su relación con las distintas variables genéticas y clinicopatológicas de los pacientes, además de su posible papel en el pronóstico y la supervivencia de éstos, así como en el diagnóstico precoz de la enfermedad.

### 1. METILACIÓN DE LOS GENES EN LA VÍA MUTADORA

La metilación del ADN constituye la principal modificación epigenética conocida en mamíferos, así como la más estudiada. Este mecanismo interviene en la regulación de varios procesos celulares tales como el desarrollo embrionario, el fenómeno del “*imprinting*”, la inactivación del cromosoma X, la estabilidad cromosómica, e incluso como un factor de protección manteniendo silenciado el ADN repetitivo (Robertson., 2005). En los mamíferos la metilación afecta solamente a las citosinas, especialmente en las regiones ricas en citosinas y guaninas, y en residuos CpG. En las regiones promotoras de los genes, existen las llamadas **islas CpG**, con un contenido en CG mayor al 50% (Bird., 2002) y generalmente, se encuentran no-metiladas en las células donde esos genes se expresan. Sin embargo, se ha descrito que en algunas

ocasiones se pueden detectar metiladas, actuando como un mecanismo inactivante de regulación de la expresión de algunos genes en las células (Laird., 2003), o de una manera incrementada en secuencias específicas debido a la edad, o de una forma aberrante en algunas enfermedades como el cáncer. La hipermetilación específica del cáncer puede afectar a varios tipos de genes con distintas implicaciones y está, probablemente, presente en todas las neoplasias. A nivel molecular, esta alteración epigenética es capaz de producir un silenciamiento transcripcional de los genes, sin cambios en su secuencia, y de proporcionar al mecanismo de la carcinogénesis la misma ventaja evolutiva que cuando ocurre una mutación (Miyakura *et al.*, 2001; Bird., 2002; Jones *et al.*, 2002).

Se considera la metilación del promotor de los genes MMR, en la carcinogénesis colorrectal esporádica desarrollada por la vía mutadora, la responsable del silenciamiento de estos genes y por consecuencia la desencadenante de la inestabilidad observada en esta vía. Por otra parte, se han descrito datos controvertidos sobre la implicación de la metilación del promotor de una serie de genes supresores en la carcinogénesis colorrectal desarrollada por esta vía. En este trabajo, hemos llevado a cabo el análisis de la metilación del promotor de los genes del sistema MMR: *MLH1* y *MSH2*, y la de los genes supresores de tumores *P15*, *P16* y *CDH1*, mediante MSP, con el objetivo de comprobar la implicación de su silenciamiento en el mecanismo de la carcinogénesis de nuestra serie de tumores colorrectales esporádicos; además de establecer el perfil genético y clinicopatológico de estos tumores y la posible implicación de este proceso en la supervivencia de los pacientes; y por otro lado intentar averiguar la existencia del fenotipo metilador “CIMP”.

Hemos detectado una alta tasa de metilación en los genes MMR en comparación con los genes supresores, siendo *MLH1* el gen que presenta la tasa más alta (19,15%: 27/141), seguido por el gen *MSH2* (11,35%: 16/141), mientras que el gen *P16* presenta una tasa del 9,2% (13/141), seguido por *P15* (2,83%: 4/141), y por último *CDH1* (2,12%: 3/141) (Figura 42). *MLH1* ha sido considerado, en varios trabajos realizados en carcinomas colorrectales y gástricos, como uno de los genes con la tasa de metilación más alta, aunque con diferentes frecuencias según las series (desde 10% hasta 85%, aproximadamente) (Hawkins *et al.*, 2002; Van Rijnsoever *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003a; Xu *et al.*, 2004; Ashktorab *et al.*, 2005). Sin embargo, en otras muchas neoplasias, como el cáncer boca, de mama, de cabeza y cuello, los sarcomas y las líneas celulares derivadas de los tumores genitourinarios, *MLH1* muestra unas frecuencias de metilación más bajas (Viswanathan *et al.*, 2003; Roa *et al.*, 2004; Puri *et al.*, 2005; Seidel *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2001). Estos resultados demuestran que la metilación del promotor del gen *MLH1* es propia de los tumores del tracto digestivo, especialmente los colorrectales desarrollados por la vía mutadora.

Por otra parte, hemos detectado una tasa de metilación en el gen *MSH2* más baja que la encontrada en *MLH1* (11,35% vs. 19,15%). Sin embargo, esta tasa es más alta que la descrita en

otros trabajos, donde no se ha detectado esta alteración en ninguno de los tumores analizados (Cunningham *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 1998; Wheeler *et al.*, 1999; Roh *et al.*, 2003), o se ha detectado, pero con una frecuencia muy baja (1,3%: un tumor de los 78 tumores analizados) (Kim *et al.*, 2003b). Incluso algunos estudios optan por no analizar la metilación del gen *MSH2* por considerarla irrelevante (Kuismanen *et al.*, 2000), por lo que se tienen pocos datos anteriores a nuestro trabajo acerca de la metilación de este gen. No obstante, nuestros resultados demuestran que la metilación de *MSH2* presenta una importante implicación en el mecanismo de la carcinogénesis colorrectal por la vía mutadora, detrás de la del gen *MLH1*.

El gen supresor de tumores *P16* constituye uno de los genes más frecuentemente alterados en las neoplasias humanas. Una de las alteraciones que afectan este gen es la metilación de su promotor descrita en diferentes tipos tumorales (Kim *et al.*, 2006b). En el presente trabajo, hemos detectado una tasa de metilación del 9,2%. Esta tasa es inferior a la descrita en otros estudios (del 15 hasta el 40% aproximadamente) en los tumores colorrectales esporádicos (Toyota *et al.*, 1999; Esteller *et al.*, 2001b; Hawkins *et al.*, 2002; Van Rijnsoever *et al.*, 2002; Schneider-Stock *et al.*, 2003; Ishiguro *et al.*, 2006). La mayoría de las series de tumores analizadas en estos estudios provienen, como la nuestra, de pacientes que han sido sometidos a una resección quirúrgica de adenocarcinomas colorrectales esporádicos, previamente al tratamiento con quimioterapia. Las excepciones las marcan los estudios de Esteller y Toyota, donde la muestra de tumores analizada en el primero proviene de un banco de tumores, con una procedencia y unas características heterogéneas, y donde la metilación de *P16* ha sido detectado con una frecuencia del 35% (38/109) (Esteller *et al.*, 2001b), mientras que en el segundo, la metilación ha sido analizada en líneas celulares, establecidas a partir de adenocarcinomas colorrectales (Toyota *et al.*, 1999), que se caracterizan por presentar unas altas tasas de metilación, y donde se encontró una frecuencia de metilación en *P16* del 35,39% (23/65). Por otra parte, en la mayoría de estos trabajos se ha analizado la misma región del promotor de *P16* mediante MSP, utilizando los mismos cebadores descritos por Herman y colaboradores (Herman *et al.*, 1996a), y que hemos utilizado nosotros también en el presente estudio. Salvo el trabajo de Toyota, donde la técnica utilizada es MCA (*Methylated CpG Island Amplification*), que consiste en la utilización de enzimas de restricción e hibridación (Toyota *et al.*, 1999). Por otro lado, estos trabajos tampoco parten de tumores inestables caracterizados por sus altas frecuencias de metilación del gen *P16*, entre 62,5% y 68% (Toyota *et al.*, 1999; Van Rijnsoever *et al.*, 2002) y 43,8% en nuestro estudio (Tabla 36 y Figura 51). La principal diferencia entre estos estudios y el nuestro sería el origen geográfico de los pacientes analizados. Efectivamente, en un estudio realizado en tumores gástricos esporádicos procedentes de 46 pacientes del norte de Brasil se analizó la metilación de los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* y se detectó una alta frecuencia de metilación en el gen *MSH2* (17,39%: 8/46) (Moura Lima *et al.*, 2008), en comparación con los dos únicos trabajos anteriores, realizados en este tipo de tumores en la población asiática (Wu *et al.*, 2000; Fang *et*

*al.*, 2004). En el primero de estos estudios no se ha detectado ningún tumor con *MSH2* metilado, mientras que en el segundo la metilación ha sido localizada únicamente en una sola isla CpG, situada en la posición -166 del promotor del gen. La única diferencia observada por los autores entre estos estudios era la procedencia de los pacientes analizados (Moura Lima *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que la interacción del ADN con los diferentes factores medio-ambientales tales como la dieta o algunos componentes químicos como los insecticidas, puede igualmente influir en las modificaciones epigenéticas que puede sufrir el genoma, incluidos los patrones de metilación de los diferentes genes (Pufulete *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2008). Así, en un trabajo comparativo entre las características moleculares del cáncer colorrectales en tres países de Oriente medio, Turquía, Jordania y Egipto, se ha detectado una frecuencia más alta de metilación en el gen *P16* en pacientes jordanos en comparación con los pacientes egipcios a pesar de las similitudes geográficas y culturales que comparten ambos países (27,1% vs. 10,3%). Esta diferencia ha sido atribuida a los factores medio-ambientales, especialmente a las diferencias en la dieta entre ambos países. Además, los autores llegan en este estudio a la conclusión de que la metilación en los diferentes genes varía en función del tipo tumoral, la localización geográfica y la exposición a los diferentes factores ambientales (Chan *et al.*, 2005).

Al contrario del gen *P16*, en el gen *P15* no se han observado tantas alteraciones, y la metilación de su promotor ha sido detectada en muy pocas neoplasias, como las hematológicas (Herman *et al.*, 1996b; Esteller *et al.*, 2001a; Kim *et al.*, 2006b). Así, en algunas series de tumores colorrectales donde se ha analizada la metilación de *P15* no se ha detectado prácticamente metilación en este gen (Herman *et al.*, 1996b; Esteller *et al.*, 2001a). En cuanto a nuestro trabajo, hemos detectado una tasa de metilación de tan sólo el 2,83%, que es una tasa muy baja, concordante con la ausencia de metilación observada en la población caucásica. Sin embargo, en otros trabajos se han detectado unas frecuencias de metilación bastante altas (26,1% y 68%) (Ishiguro *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004). En este caso el origen geográfico de los pacientes podría también explicar la diferencia entre las frecuencias observadas en los estudios citados, ya que los trabajos de Ishiguro y Xu han sido realizados en la población asiática, mientras que los trabajos de Herman y Esteller han sido realizados en población caucásica y norteamericana.

El gen *CDHI* por su parte, es otro gen supresor de tumores cuya metilación del promotor ha sido observada en varias neoplasias, como el cáncer de mama, el de pulmón y el nasofaríngeo (Esteller *et al.*, 2001b; Cheng *et al.*, 2001; Caldeira *et al.*, 2006; Shimamoto *et al.*, 2004; Nakata *et al.*, 2006; Tsao *et al.*, 2003). En nuestra serie de tumores colorrectales hemos detectado una baja tasa de metilación del gen *CDHI* (2,12%). Este resultado concuerda con diversos estudios previos, donde no se ha detectado ninguna relación entre la alteración de este gen y la carcinogénesis colorrectal (Xu *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006a). Sin embargo, en el trabajo de Wheeler (Wheeler *et al.*, 2001) se ha detectado una tasa muy alta de metilación en *CDHI* (36%), y la metilación de este gen ha sido considerada como responsable de la reducción de la expresión



de la E-cadherina en los tumores estudiados por dicho grupo. Ese estudio partía de dos grupos de tumores colorrectales: el primero compuesto de 14 tumores colorrectales esporádicos, donde los autores detectaron una tasa de metilación del 36% (5/14), y el segundo compuesto de 14 tumores colorrectales asociados a la colitis ulcerosa, donde se detectó una tasa de metilación del 57% (8/14), lo que originaba en el conjunto de la muestra una tasa de metilación del 46% (13/28) (Wheeler *et al.*, 2001). El tamaño de la muestra analizada podría estar en el origen de esas altas y discrepantes frecuencias observadas.

Reuniendo los resultados de todos los genes analizados respecto a la metilación de su región promotora, observamos que la metilación de los genes MMR, especialmente *MLH1*, y también *MSH2*, tiene una gran implicación en el mecanismo de la carcinogénesis de los tumores colorrectales esporádicos desarrollados por la vía mutadora, seguida por la del gen supresor de tumores *P16*, mientras que no encontramos evidencias de la implicación de la metilación de los genes *P15* y *CDHI* en este proceso.

Cuando estratificamos por grupos MSI, observamos una relación directa entre el grado de inestabilidad del tumor y la tasa de metilación de éste, ya que los tumores MSI-H presentan una mayor frecuencia de metilación, seguidos por los tumores MSI-L y MSS (Figura 56), y siendo *MLH1*, de nuevo, el marcador con la frecuencia de metilación más alta (62,5% en los tumores MSI-H) (Tabla 24 y Figura 44). De nuevo aquí, nuestros datos confirman que la alteración epigenética de *MLH1* es la principal responsable de la aparición de MSI, característica de la vía de tumorigénesis estudiada, tal como propusieron varios autores (Kane *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 1998; Toyota *et al.*, 1999; Kuismanen *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2003). Pero además, nuestros resultados, parecen indicar que la metilación del gen *MSH2* también tiene una importante implicación en la inestabilidad de microsatélites (50% en los tumores MSI-H; Tabla 30 y Figura 47), seguida por la metilación del marcador *P16* (43,8% en los tumores MSI-H; Tabla 36 y Figura 51). Por otra parte, en la Figura 59, observamos que los tumores portadores de dos o más loci metilados presentan necesariamente uno de los dos genes MMR metilado, especialmente *MLH1*. Así, los tres tumores con metilación en *CDHI* presentan igualmente metilación en *MLH1* y en uno de los tres también en *MSH2*. Los dos tumores de la figura con el gen *P15* metilado presentan también metilación en *MLH1*, y de los once tumores con el gen *P16* metilado hay sólo uno que no presenta metilación en ningún gen MMR, y este tumor es MSI-L. Estos resultados corroboran el papel de la metilación, especialmente del gen *MLH1* y del gen supresor *P16* (Toyota *et al.*, 1999; Schneider-stock *et al.*, 2003), pero también reflejan la de *MSH2*, no descrita hasta ahora, como mecanismos desencadenantes de la inestabilidad característica de la vía mutadora.

El fenotipo CIMP ha sido propuesto, hace algunos años, como una vía alternativa, la vía metiladora, en la carcinogénesis colorrectal (Toyota *et al.*, 1999). Los tumores que progresan por esta vía presentan una serie de características clinicopatológicas y genéticas propias,

especialmente una alta tasa simultánea de metilación, afectando a varios genes, supresores de la familia *MINT*, además de otros con un papel clave en la progresión tumoral como los genes *MLH1*, *P16* y *THBS1* (Toyota *et al.*, 1999; Toyota *et al.*, 2000). Se observó además la existencia de una distribución bimodal de esos tumores: CIMP+ y CIMP-, en función del número de marcadores metilados en un panel compuesto por los genes citados anteriormente, y que han sido analizados en una serie de líneas celulares derivadas de adenomas y carcinomas colorrectales; siendo los tumores CIMP+ los que presentan una alta tasa de MSI además de alteraciones en los mutadores secundarios como *TGFBR2* y en el oncogen *KRAS2*, mientras que los tumores CIMP- presentan menos estas alteraciones (Toyota *et al.*, 1999). Posteriormente, varios autores se han sumado a la existencia de este fenotipo y se han propuesto diferentes paneles de marcadores, de modo análogo al panel de los marcadores estandarizados para el análisis de MSI, con el fin de unificar la detección y el análisis de este grupo de tumores (Van Rijnsoever *et al.*, 2002; Samowitz *et al.*, 2005; Weisenberger *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2008; Boland *et al.*, 2009). En nuestro estudio, ningún tumor presenta metilación simultánea en los cinco loci analizados y sólo uno es portador de esta alteración en cuatro de los cinco loci (Figura 57). Cuando comparamos con el nivel de inestabilidad de los microsatélites, observamos una distribución continua, y gradual, de los tumores, puesto que el número de loci metilados aumenta a medida que aumenta la inestabilidad del tumor (Figura 58); siendo el único tumor portador de cuatro loci metilados un tumor MSI-H, mientras que el 86,1% de los tumores sin ningún marcador metilado son estables MSS (Figura 58). Nuestro resultado coincide con los trabajos de Hawkins y Yamashita, en tumores colorrectales (Hawkins *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2003), y el de Eads, en el cáncer de esófago (Eads *et al.*, 2001), donde estos autores tampoco observan la distribución bimodal descrita por Toyota y en cambio llegan, igual que nosotros, a la conclusión de que el mecanismo de la metilación en el cáncer es un simple proceso estocástico, con la posterior selección clonal de las células que tienen ventajas de crecimiento debido al silenciamiento de ciertos genes con un papel clave en el mecanismo de la progresión tumoral. Poynter y sus colaboradores observaron también una distribución gradual de la metilación en función de la inestabilidad de los tumores analizados en su trabajo: 60% en los tumores MSI-H, 3,1% en los tumores MSI-L y 0,7% en los tumores MSS. Sin embargo, los autores consideraron que los tumores MSI-H de la serie eran igualmente CIMP+ por la simple razón de presentar el gen *MLH1* metilado (Poynter *et al.*, 2008). El descubrimiento del fenotipo CIMP por Toyota se puede atribuir a varios factores, uno de ellos es la utilización de líneas celulares, que suelen, ya de por sí, presentar unas altas tasas de metilación. En segundo lugar, la utilización de dos grupos de tumores independientes MSI+ y MSI-, sin un grupo de inestabilidad intermedio (como los tumores MSI-L en nuestro caso (Figura 58)), por lo que es de esperar encontrar dos niveles independientes de metilación: una alta tasa de metilación caracterizando los tumores MSI+ (que corresponden a los tumores MSI-H en nuestro estudio), y una baja tasa de metilación en los tumores MSI- (que corresponden a los tumores MSS

en nuestro caso), llevando así a obtener una distribución bimodal y no gradual como la que observamos en el presente estudio (Figura 58). No obstante, en los últimos años, el concepto del fenotipo CIMP ha ido cambiando y muchos autores lo utilizan actualmente para referirse a una simple tendencia de los tumores a acumular metilación en algunos marcadores.

La metilación del promotor ha sido detectada en tumores pertenecientes a pacientes de edad avanzada (Hawkins *et al.*, 2002; Van Rijnsoever *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2003; Samowitz *et al.*, 2005; Poynter *et al.*, 2008). En nuestro estudio no se observan diferencias entre las medias de edad de los grupos con y sin metilación en los marcadores *MLH1*, *MSH2* y *P16* (Tablas 23, 29 y 35 respectivamente). Cuando segmentamos por grupos MSI tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas entre las medias de edad, salvo en el caso del gen *MLH1* donde la media de edad de los pacientes con tumores MSI-H y portadores del gen *MLH1* metilado es mayor que la de los pacientes sin esta alteración (Tabla 26). Cuando comparamos las tasas de metilación entre los grupos de mayores y menores de 50 años de edad, tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas, puesto que los pacientes de ambos grupos presentan unas tasas de metilación más o menos similares en los marcadores *MLH1* y *P16* (Tablas 23 y 35), mientras que en *MSH2*, los pacientes menores de 50 años de edad presentan un tasa de metilación incluso ligeramente mayor que los pacientes mayores de 50 años (Tabla 29). Por otra parte, los tumores con metilación en los genes *P15* y *CDHI* sí que pertenecen a pacientes mayores de 50 años, aunque las diferencias tampoco son estadísticamente significativas en este caso, debido al escaso número de tumores con estas alteraciones. Al segmentar por niveles MSI, se observa que los tumores MSI-H pertenecientes a los pacientes mayores de 50 años de edad presentan unas altas frecuencias de metilación en los marcadores *MLH1*, *MSH2* y *P16* (tablas 26, 32 y 38 respectivamente). Toyota propuso en su trabajo la existencia de dos tipos de metilación: la de tipo A (*Age*), observada en tejidos sanos debido al envejecimiento de la maquinaria celular, y la de tipo C (*Cancer*), relacionada con la enfermedad y detectada solamente en los tumores. Además cada uno de estos tipos afecta a genes distintos según el mismo autor (Toyota *et al.*, 1999). Sin embargo, otros autores detectaron la metilación de los genes específicos de los tejidos tumorales también en tejidos sanos (Yamashita *et al.*, 2003). La ausencia de significación en relación con la metilación de los marcadores analizados y los niveles de edad en nuestra serie puede deberse, además, al hecho de que tenemos un escaso número de pacientes menores de 50 años de edad (17 pacientes; 10,9%), frente a 138 pacientes mayores de 50 años (89%). Se trataría, por tanto, de una serie con una media de edad ya bastante elevada. Además, no hay que olvidar que el cáncer es un problema de salud principalmente debido a la edad, por lo que la metilación es un fenómeno relacionado en general con la edad avanzada independientemente del tipo de tejido afectado (Yamashita *et al.*, 2003).

Por otra parte, la metilación ha sido frecuentemente observada en pacientes de sexo femenino (Hawkins *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2003; Samowitz *et al.*, 2005; Poynter *et al.*,

2008). En nuestro estudio observamos esta tendencia sólo en los casos del gen *MLH1* y de *CDH1*, aunque la diferencia no alcanza significación estadística para ninguno de los dos genes (Tabla 23; dato no mostrado para *CDH1*). Al comparar con los tres niveles MSI, observamos que *MLH1* aparece frecuentemente metilado en los tumores MSI-H de los varones y en los tumores MSI-L y MSI-H de las mujeres (Tabla 26), mientras que los marcadores *MSH2* y *PI6* aparecen frecuentemente metilados en los tumores MSI-L en varones y en los tumores MSI-H en mujeres (Tablas 32 y 38 respectivamente). La asociación de la metilación, en los tumores MSI-H, con el sexo femenino ya ha sido observada previamente (Poynter *et al.*, 2008). En ese estudio, se observó que los tumores MSI-H pertenecientes a las mujeres presentaban un 66% de metilación en el gen *MLH1*, frente a un 34% en los tumores MSI-H de los varones. Varias hipótesis han sido postuladas para explicar la asociación de la metilación con el sexo femenino. Se ha descrito que unos niveles bajos de estrógenos, observados por ejemplo en mujeres con menopausia prematura, se asocian con unos altos niveles de metilación en el cáncer colorrectal (Issa, 2002). Se ha descrito también que un bajo consumo de folato, un micronutriente con gran importancia en la síntesis de los nucleótidos y en la metilación del ADN, se puede asociar a un riesgo incrementado de cáncer, especialmente en mujeres y, contrariamente, las dietas ricas en este elemento son protectoras frente a este tipo de neoplasia (Terry *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2002). Asimismo, se ha observado que un alto consumo de colina, metabolito necesario para la formación y el mantenimiento de las membranas celulares y que es también un donante de grupos metilo, se asocia con un alto riesgo de cáncer colorrectal en mujeres (Cho *et al.*, 2007). El consumo de alcohol (más de 30g/día) por parte de las mujeres con una historia familiar de cáncer colorrectal, ha sido igualmente considerado como un factor de riesgo en la aparición de los adenocarcinomas colorrectales en mujeres (Fuchs *et al.*, 2002). En nuestro estudio, sin embargo, no podemos evaluar la asociación de la metilación en mujeres con estos factores por no disponer de esa información adicional sobre los pacientes, aunque la media de edad de las mujeres de la presente serie es de  $69,07 \pm 13,07$  años, lo que implica que la mayoría de ellas ya son post-menopáusicas.

Los tumores portadores de metilación presentan una localización preferente en el colon derecho (Hawkins *et al.*, 2002; Van Rijnsoever *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2003; Samowitz *et al.*, 2005; Poynter *et al.*, 2008). En nuestro trabajo también se observa que los tumores del colon proximal presentan frecuentemente metilados los genes *MLH1*, *MSH2* y *PI6* (Tablas 23, 29 y 35). Cuando segmentamos por grupos MSI, observamos que los tumores MSI-H con metilación en esos marcadores se localizan en el colon derecho (Tablas 26, 32 y 38), lo que coincide con la localización habitual de este tipo de tumores (Kuismanen *et al.*, 2000; Hawkins *et al.*, 2002; Van Rijnsoever *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2003; Samowitz *et al.*, 2005). La localización derecha preferente de la metilación y de la inestabilidad de microsatélites forman parte de las múltiples características diferenciales entre el colon proximal y distal (Tabla 1), atribuidas al origen embrionario diferente de cada una de las secciones del colon (Iacopetta, 2002). No obstante, la

verdadera causa de esta asimetría sigue sin determinarse completamente, puesto que las características proliferativas de la mucosa colónica parecen ser homogéneas a lo largo de su longitud y, consisten en una alta actividad mitótica y una alta tasa de renovación de las células madre, lo que implica unas altas tasas de proliferación celular, a excepción del recto donde se ha observado que estas tasas son más bajas (Potten *et al.*, 1992; Yamashita *et al.*, 2003). Por consiguiente, la proliferación celular, por sí sola, no explicaría las diferencias moleculares y patológicas entre ambas secciones del colon.

Los tumores MSI-L con metilación en estos genes, por su parte, muestran unas localizaciones diferentes en función del marcador metilado. Así, los tumores MSI-L portadores del gen *MLH1* metilado presentan una localización preferencial en el colon distal, igual que los tumores estables con la misma alteración (Tabla 26), mientras que los portadores de metilación en *MSH2* y *P16* se localizan en el colon proximal (Tablas 32 y 38). Este resultado apoyaría el hecho de que los tumores MSI-L, al desarrollarse a través de la vía mutadora intermedia, muestran unas características comunes a los tumores estables y a los de alta inestabilidad de microsatélites (Oliart *et al.*, 2006), como la localización de los tumores metilados en los marcadores estudiados, en esta ocasión.

Por otro lado, la metilación ha sido detectada en las etapas tempranas del desarrollo tumoral (Toyota *et al.*, 1999; Miyakura *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003b; Xu *et al.*, 2004; Boland *et al.*, 2009). En el presente estudio, los tumores portadores de metilación en los genes analizados han sido detectados en diferentes etapas del progreso tumoral: los tumores con metilación en *MLH1* se observan en los estadios B y C de Dukes, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 23). Los tumores con metilación en *MSH2* y *P16* se encuentran en los estadios D y B de Dukes (Tablas 29 y 35), mientras que los cuatro tumores con metilación en *P15* están en el estadio B de Dukes. Cuando comparamos con los tres niveles MSI, observamos que los tumores MSI-H portadores de metilación en *MLH1*, *MSH2* o *P16* se encuentran principalmente en el estadio B de Dukes y en los estadios tempranos A+B y los tumores MSI-L y MSS con las mismas alteraciones se encuentran en unos estadios más avanzados, entre C y D de Dukes (Tablas 26, 32 y 38). Por otra parte, la detección de la metilación del gen *P16* en unos estadios avanzados del desarrollo tumoral (en el estadio C, precisamente) ya ha sido referida previamente (Wiencke *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2003; Goto *et al.*, 2009), e incluso se ha observado una mayor frecuencia de metilación en este gen en los carcinomas en comparación con los adenomas colorrectales (Kim *et al.*, 2006a). Este resultado demostraría que la alteración del gen *P16* contribuye a la progresión de los tumores colorrectales esporádicos desarrollados por la vía mutadora.

La metilación parece igualmente influir en otros factores del desarrollo tumoral como la diferenciación. Así, observamos que los tumores portadores de *MLH1*, *MSH2* o *P16* metilados son pobremente diferenciados, aunque la diferencia es estadísticamente significativa sólo en el

caso del gen *P16* (Tablas 23, 29 y 35 respectivamente). Cuando comparamos con los niveles MSI, encontramos esta asociación en el caso de los tumores MSI-H portadores de metilación en *P16* (Tabla 38), y también en los tumores MSI-H con metilación en *MSH2*, que son bien y pobremente diferenciados (Tabla 32). La asociación de la metilación del gen *P16* con la pobre diferenciación ya ha sido descrita (Wiencke *et al.*, 1999; Burri *et al.*, 2001; Hawkins *et al.*, 2002; Maeda *et al.*, 2003), y reflejaría la implicación de la inactivación de este gen en la aparición de un fenotipo más agresivo de los tumores colorrectales (Wiencke *et al.*, 1999; Maeda *et al.*, 2003). Esta influencia explicaría igualmente el hecho de que una alta proporción de tumores con el gen *P16* metilado, presenten el fenotipo mucosecretor (Tabla 35), típico de tumores con alta agresividad. Al comparar con los grupos MSI, observamos que tanto los tumores altamente inestables, como los MSI-L, con *P16* metilado presentan el fenotipo mucosecretor (Tabla 38). Asimismo, podría explicar también la asociación de la metilación de *P16* con la aparición de metástasis observada en los tumores MSI-L con esta alteración (Tabla 38). En otros trabajos se observó un resultado similar, ya que los tumores con metilación en *P16* mostraban invasión linfática (Goto *et al.*, 2009). Los tumores portadores de metilación en los genes del sistema MMR, *MLH1* y *MSH2*, sin embargo, no se asocian al fenotipo mucosecretor, ni en general (Tablas 23 y 29 respectivamente), ni dentro de los grupos MSI (Tablas 26 y 32 respectivamente), aunque por otra parte, observamos que todos los tumores MSI-H con metástasis muestran el gen *MLH1* metilado (Tabla 26). Estos resultados sugieren que el gen *MLH1* así como *MSH2* intervienen también en la progresión tumoral, pero con diferente implicación que el gen *P16*, ya que la verdadera consecuencia de la alteración de los genes MMR es la aparición de la inestabilidad genómica en esta vía de tumorigénesis. En cuanto al gen *P16*, éste representa un potente supresor tumoral por su papel en la parada del ciclo celular y en la inducción de la apoptosis, además de intervenir en varios mecanismos celulares tales como la diferenciación, el crecimiento celular y la senescencia (Cánepa *et al.*, 2007; Gil *et al.*, 2006), por lo que la alteración de este gen supone a la célula una importante desregulación de estos mecanismos y por lo tanto la aparición de un fenotipo más agresivo. Tal fenotipo es característico de las células tumorales con una reducida respuesta a la muerte celular programada como es el caso de la agresividad tumoral y el incremento del potencial metastásico observados en las células tumorales con mutaciones en el gen supresor *TP53*, además de la baja supervivencia observada en los pacientes portadores de estas mutaciones (Soussi *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2005b; Vousden *et al.*, 2007).

Finalmente, en este estudio, observamos que solamente tres tumores de los ciento cuarenta y uno analizados presenta metilación en *CDHI* (Figura 42), pero una de las características que comparten estos tumores es la presencia de metástasis. Una de las múltiples funciones que tiene el gen supresor de tumores *CDHI* es el mantenimiento de la adhesión celular, por lo que las alteraciones de este gen estarían en el origen de la aparición de la invasión tumoral y de la metástasis en los pacientes. Todo ello sugiere que la metilación del promotor de *CDHI* no



parece formar parte de las alteraciones que están en el origen de la carcinogénesis colorrectal desarrollada por la vía mutadora, lo cual ya ha sido descrito previamente por otros autores (Xu *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006a), aunque sí parece tener relación con la aparición de metástasis en los tumores de los pacientes donde este gen está metilado.

En relación con la supervivencia de los pacientes, las metilaciones en los genes estudiados muestran resultados contrapuestos. Así, a pesar de que la metilación de *MLH1* y *MSH2* muestra una clara asociación con la inestabilidad tumoral, ésta no parece influir en la supervivencia general de los pacientes de nuestra serie. Observamos que no existen diferencias entre las medias de supervivencia de los pacientes con y sin metilación en los genes *MLH1* y *MSH2* (Tabla 25; Figura 45 y Tabla 31; Figura 48 respectivamente). Esto concuerda con los resultados de supervivencia observados por otros autores (Salvesen *et al.*, 2000; Van Rijnsoever *et al.*, 2002; Hawkins *et al.*, 2002), sin embargo, difiere de lo observado por el grupo de Kang, donde los pacientes portadores de metilación en *MLH1* presentan una mejor supervivencia (Lee *et al.*, 2008). Dentro de los grupos MSI se observa que los pacientes con tumores MSI-L y metilación en *MLH1* presentan una mayor supervivencia en comparación con los pacientes con los mismos tumores y sin metilación en *MLH1* (Tabla 28 y Figura 46B), mientras que en los pacientes con tumores MSI-H este resultado se invierte, siendo los pacientes portadores del gen *MLH1* metilado los que presentan una peor supervivencia, aunque las diferencias no alcancen la significación estadística (Tabla 28 y Figura 46C). Estos resultados contrarios pueden deberse al hecho de que los tumores MSI-L representan una entidad distinta a los tumores MSS y MSI-H (Oliart *et al.*, 2006) y, por lo tanto, mostrarían unas distintas respuestas frente a las mismas alteraciones genéticas. Por otra parte, los pacientes con tumores MSS y metilación en *MSH2* muestran una tendencia a tener una mayor supervivencia (curva de Kaplan-Meier Figura 49A), aunque tampoco en este caso se alcance la significación estadística, debido, con toda probabilidad, al escaso número de pacientes con metilación en el marcador *MSH2*. Por el contrario, los pacientes con tumores portadores de metilación en el gen *P16* muestran una importante y significativa bajada de la supervivencia en comparación con los pacientes sin dicha alteración (Tabla 37 y Figura 52). Varios estudios previos han referido también una asociación negativa (en ocasiones simplemente una tendencia, sin significación estadística) entre la metilación del gen *P16* y la supervivencia de los pacientes (Esteller *et al.*, 2001c; Maeda *et al.*, 2003; Ishiguro *et al.*, 2006). Esta baja supervivencia la observamos también en el grupo de los pacientes con tumores MSI-L y MSI-H con metilación en *P16*, aunque en este último grupo la diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 40 y Figuras 53B y 53C respectivamente). Estos resultados, tomados en conjunto, demuestran que, además de la implicación en el proceso de la progresión tumoral, la metilación de *P16* se asocia también a un peor pronóstico de los pacientes. Estas observaciones han hecho que se proponga la utilización de la metilación del gen *P16* como un biomarcador, así como un factor de peor pronóstico de los pacientes, no solo en

cáncer colorrectal, sino en otros tipos tumorales (Esteller *et al.*, 2001c; Maeda *et al.*, 2003; Dominguez *et al.*, 2003; Kawamoto *et al.*, 2006), lo que puede llegar a tener implicaciones en el establecimiento de terapias coadyuvantes más adecuadas a esos pacientes. Las curvas de Kaplan-Meier (Figuras 54 y 55), por su parte, muestran que los pacientes portadores del gen *P15* metilado presentan mejor supervivencia que los pacientes sin dicha alteración, mientras que los pacientes con el gen *CDHI* metilado presentan una peor supervivencia en comparación con los pacientes sin esa alteración. Sin embargo, ninguno de estos resultados alcanza significación estadística debido al escaso número de pacientes portadores de metilación en los marcadores citados.

Por otra parte existe mucha controversia en la bibliografía respecto a la asociación de la metilación con la alteración de los genes *KRAS2* y *TP53*. En nuestro trabajo no observamos una relación directa entre la metilación de *MLH1* y las mutaciones del oncogen *KRAS2* (Tabla 24), a diferencia de otros trabajos previos que sí la encuentran (Toyota *et al.*, 2000; Hawkins *et al.*, 2002; Boland *et al.*, 2009). Los tumores portadores de metilación en los genes *MSH2* y *P16*, por su parte, muestran una tendencia a presentar mutaciones en este gen (Tablas 30 y 36 respectivamente). Cuando estratificamos por grupos MSI, observamos que los tumores MSI-H no mutados en *KRAS2* están más frecuentemente metilados en los genes *MLH1* y *MSH2* que los tumores estables y con baja inestabilidad (tablas 27 y 33 respectivamente). Sin embargo, los tumores estables y de baja inestabilidad mutados en *KRAS2* sí que presentan frecuentemente metilados los genes *MLH1* y *MSH2*, aunque hay que interpretar este resultado con cautela debido al escaso número de tumores MSI-H con mutación en el oncogen *KRAS2* en ambos casos (Tablas 27 y 33 respectivamente). La metilación del gen supresor *P16* tampoco se asocia con la alteración del oncogen *KRAS2* dentro del grupo de tumores MSI-H. Los tumores MSI-L con mutaciones en *KRAS2*, por su parte, presentan frecuentemente metilación en *P16*, aunque en este caso también hay que interpretar el resultado con cautela por el reducido número de tumores con el gen *P16* metilado (Tabla 39).

Los análisis de la relación entre la metilación de los marcadores *MLH1*, *MSH2* y *P16*, y la LOH en el gen *TP53* revelaron que no existe asociación entre las mencionadas alteraciones (Tablas 24, 30 y 36, respectivamente). Al estratificar por grupos MSI, observamos que los tumores MSI-H y MSI-L están frecuentemente metilados en *MLH1*, independientemente de la presencia de LOH en *TP53* (Tabla 27). Los tumores MSI-H frecuentemente metilados en *MSH2* o en *P16*, por su parte, no presentan LOH en *TP53*, mientras que los tumores MSI-L presentan metilación en *MSH2* independientemente de la LOH de *TP53*. Los tumores estables en su mayoría no presentan metilación en estos genes para poder realizar una comparación (Tablas 33 y 39 respectivamente).

Todos estos resultados corroboran el hecho de que la metilación del promotor de los genes analizados y la alteración de los genes *KRAS2* y *TP53* son dos fenómenos independientes, caracterizando cada uno una vía de tumorigénesis colorrectal distinta, la vía mutadora y la vía



supresora respectivamente, tal como ha sido observado en estudios anteriores (Salvesen *et al.*, 2000; Van Rijnsoever *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2003; Miyakura *et al.*, 2003; de Vogel *et al.*, 2009). Con respecto a los tumores MSI-L, éstos presentan unas características propias de ambas vías por desarrollarse a través de la vía mutadora intermedia (Oliart *et al.*, 2006), lo que explicaría que estos tumores presenten metilación en los marcadores analizados además de las alteraciones de *TP53* y *KRAS2* (Tablas 27, 33 y 39).

La descripción de unos resultados contradictorios por parte de los autores, en cuanto a la asociación de la metilación con las mutaciones en *TP53* y *KRAS2* podría estar debida también en parte a la diferente metodología empleada en cada estudio, dando lugar a unos resultados diferentes en cada caso. En los estudios previos se han utilizado técnicas como la SSCP, la SSCP con fluorescencia, la Blunt-end SSCP o la inmunohistoquímica para analizar las mutaciones en *TP53*, mientras que se ha utilizado la AS-PCR, la REMS-PCR (*Restriction Endonuclease-Mediated Selective Polymerase Chain Reaction*), la SSCP o la Blunt-end SSCP para analizar las mutaciones del gen *KRAS2* (Toyota *et al.*, 2000; Van Rijnsoever *et al.*, 2002; Hawkins *et al.*, 2002; Miyakura *et al.*, 2003; Yamashita *et al.*, 2003). Sin embargo, con ello no se explicarían las diferencias observadas, sobre todo teniendo en cuenta que en varios estudios se ha utilizado, por ejemplo, la SSCP y sin embargo el resultado no era el mismo (Toyota *et al.*, 2000; Van Rijnsoever *et al.*, 2002). Por otra parte, en las diferentes series analizadas, la localización geográfica tampoco podría explicar completamente estas diferencias, puesto que hay trabajos realizados en población norteamericana donde los resultados encontrados son contrapuestos (Toyota *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2003) y algo similar ocurre en estudios de población australiana (Hawkins *et al.*, 2002; Van Rijnsoever *et al.*, 2002). Finalmente, la explicación más plausible sería que ambas vías, supresora y mutadora, no son totalmente independientes, presentando solapamientos, por lo que algunos tumores pueden presentar ambos fenotipos (Fearnhead *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2003).

En nuestro trabajo observamos una asociación positiva entre la metilación de los genes *MLH1*, *MSH2* y *P16*, y las mutaciones de los genes *TGFBR2* y *BAX* (Tablas 24, 30 y 36), aunque en el caso de *MSH2* las diferencias no son estadísticamente significativas en relación con la alteración de *BAX*. Cuando se parcelan los tumores por los niveles de inestabilidad de microsatélites observamos que los tumores MSI-H con metilación en cualquiera de estos tres marcadores, *MLH1*, *MSH2* y *P16*, presentan igualmente más frecuentemente mutaciones en *BAX* y *TGFBR2*, aunque hay de tener reservas a la hora de interpretar los resultados, ya que en varios casos existe un escaso número de tumores, por lo que algunas de estas asociaciones no son estadísticamente significativas. Además, merece destacarse que los tumores MSI-L y estables con metilación en *MLH1*, *MSH2* y *P16* no presentan mutaciones en ninguno de los mutadores secundarios (Tablas 27, 33 y 39, respectivamente). La repetición A<sub>10</sub> en el tercer exon, y GT<sub>3</sub> en el séptimo exon del gen *TGFBR2*, y la repetición G<sub>8</sub> en el tercer exon del gen *BAX* (Lu *et al.*,

1995; Akiyama *et al.*, 1996; Rampino *et al.*, 1997), hacen que la alteración de estos dos mutadores secundarios sea una consecuencia directa y esperada a la alteración de los mutadores primarios en la secuencia de la tumorigénesis colorrectal desarrollada por la vía mutadora (Figura 8) (Markowitz *et al.*, 1995; Rampino *et al.*, 1997; Chung, 2000; Duval *et al.*, 2002; Søreide *et al.*, 2006). Tal asociación ha sido igualmente observada en otros estudios (Toyota *et al.*, 2000; Ogino *et al.*, 2007), donde se detectaron unas altas frecuencias de mutación en el gen *TGFBR2* en los tumores con metilación en *MLH1*. Por otra parte, la alteración de *BAX* y *TGFBR2* caracteriza especialmente los tumores con una alta inestabilidad de los microsatélites (Duval *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2006; Ogino *et al.*, 2007), lo cual explicaría que, en nuestro estudio, los tumores MSI-L no presenten asociación entre la metilación del promotor de los genes *MLH1* y *MSH2*, y la alteración de los mutadores secundarios *BAX* y *TGFBR2*. De hecho, cuando analizamos la distribución de las mutaciones en *BAX* y *TGFBR2* en función de la inestabilidad de los microsatélites, observamos que todos los tumores con el gen *BAX* mutado son MSI-H, y de los 14 tumores con el gen *TGFBR2* mutado, 13 son MSI-H, y sólo uno es MSI-L (Tabla 18 y Figura 39; Tabla 13 y Figura 35 respectivamente). Nuestros análisis revelaron que las alteraciones de *BAX* y *TGFBR2* se asocian también con la metilación del gen *P16*. No obstante, la alteración de estos mutadores secundarios podría aparecer, en estos tumores, no como una consecuencia directa a la metilación del gen *P16*, sino simplemente que los dos fenómenos aparecen juntamente porque ambos forman parte de las alteraciones características de los tumores MSI-H desarrollados por la vía mutadora.

Por otro lado, no observamos ninguna asociación entre la metilación del gen *MLH1* y la LOH del gen *APC*, ni en general (Tabla 24), ni cuando segmentamos por grupos MSI (Tabla 27). Este resultado concuerda con otros trabajos anteriores (De Vogel *et al.*, 2009). Sin embargo, los tumores con metilación en *MSH2* y *P16*, sí que presentan LOH en *APC*, aunque esta asociación, con relación a *MSH2*, no es estadísticamente significativa (Tablas 30 y 36 respectivamente). Al segmentar por grupos MSI, observamos que los tumores MSI-H y MSI-L con metilación en *MSH2* presentan LOH en *APC*, al contrario de los tumores estables que no la presentan (Tabla 33). Por otra parte, los tumores MSI-H con metilación en *P16* presentan también LOH en *APC*, al contrario de los tumores MSI-L y MSS que no la presentan (Tabla 39). Nuestros resultados son diferentes de los observados en otros trabajos, donde la alteración del gen *APC* ha sido observada en bajas frecuencias en los tumores con una alta inestabilidad de microsatélites y que presentan metilación en diferentes marcadores analizados como *MLH1* y *P16* (Yamashita *et al.*, 2003). El gen *APC* juega un papel muy importante en la carcinogénesis colorrectal y la alteración de éste se considera como el primer desencadenante del mecanismo de la malignización en los tumores colorrectales (Figura 8). Algunos autores relacionan la alteración de *APC* únicamente con la vía supresora, mientras que otros también la relacionan con la vía mutadora (Chung, 2000; Søreide *et al.*, 2006; de Vogel *et al.*, 2009). No obstante, parece existir coincidencia en que las mutaciones

de este gen constituyen un acontecimiento temprano en la carcinogénesis colorrectal, que tiene lugar antes de la diferenciación tumoral hacia CIN o MSI, por lo que su alteración es independiente de los sucesos que ocurren posteriormente en la secuencia de la progresión tumoral, como la metilación, e independiente también del grado de inestabilidad que pueda presentar el tumor (Tomlinson *et al.*, 1998; Chung, 2000). Se considera la alteración del gen *DCC* como un evento tardío característico de la vía supresora (Figura 8), razón por la cual en el presente estudio no observamos ninguna relación entre la metilación de los promotores de *MLH1*, *MSH2* y *P16*, y la LOH en el gen *DCC* (Tablas 24, 30 y 36). Dentro de los grupos MSI, observamos una relación inversa entre la metilación de *MLH1* y la LOH en *DCC* (Tabla 27), así como entre esta última en los tumores MSI-H y la metilación de *MSH2* y de *P16*, mientras que los tumores MSI-L con metilación en estos dos marcadores sí que se asocian frecuentemente con la LOH de *DCC* (Tablas 36 y 39), debido a que estos tumores progresan a través de la vía mutadora intermedia, tal como se ha mencionado anteriormente.

Los tumores portadores de metilación en el gen *MLH1* no presentan LOH en este mismo gen aunque esta diferencia no alcance significación estadística (Tabla 24). Asimismo, observamos una relación inversa entre ambas alteraciones cuando segmentamos por grupos MSI (Tabla 27). Este resultado demuestra una vez más que el mecanismo principal del silenciamiento del gen *MLH1* en los tumores inestables desarrollados por la vía mutadora es la metilación del promotor de éste, tal como ha sido mencionado anteriormente, y tal como ha sido descrito por varios autores (Kane *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 1998; Toyota *et al.*, 1999; Kuismanen *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2001; Yuen *et al.*, 2002; Poynter *et al.*, 2008). Justamente cuando analizamos la LOH del gen *MLH1* en la presente serie de tumores colorrectales observamos que de los 91 tumores sometidos a este análisis sólo el 8,8% presenta tal alteración (8/91), y cuando comparamos con los niveles MSI, observamos que ningún tumor MSI-H presenta LOH en *MLH1*, mientras que el 10% (7/70) de los tumores MSS y el 7,7% (1/13) de los tumores MSI-L la presenta, aunque esta comparación tampoco es estadísticamente significativa (Tabla 10). Se ha descrito que la metilación del gen *MLH1* es bialélica (Veigl *et al.*, 1998; Kuismanen *et al.*, 2000), por lo tanto esta alteración es capaz de inducir el silenciamiento completo de este gen, lo que explicaría que ningún tumor MSI-H de nuestra serie presente la LOH además de la metilación del promotor de *MLH1* (Figura 50). Sin embargo, este no es el caso del gen *MSH2*. En primer lugar, observamos que los tumores con metilación en *MSH2* también demuestran LOH en este gen (Tabla 30). Dentro de los grupos MSI, observamos también una asociación positiva entre la metilación y la LOH de *MSH2* en los tumores MSI-H (Tabla 33). Asimismo, la Figura 50 demuestra que cuatro de los seis tumores MSI-H portadores de LOH en *MSH2* presentan metilación en este gen (66,7%). Los tumores MSI-L, por su parte, presentan metilación en *MSH2* independientemente de la presencia de la LOH en el mismo gen (Tabla 33). Por otro lado, cuando analizamos la LOH del gen *MSH2* en nuestra serie de tumores colorrectales

observamos que ésta demuestra una tasa más alta en comparación con la LOH del gen *MLH1* (12%: 18/150 en *MSH2* vs. 8,8%: 8/91 en *MLH1*). Además, la asociación de la LOH con los niveles MSI es estadísticamente significativa, y la demuestra el 37,5% (6/16) de los tumores MSI-H, frente al 17,6% (3/17) de los tumores MSI-L y el 7,7% (9/117) de los tumores estables (Tabla 10). Este resultado sugiere que el silenciamiento del gen *MSH2* podría necesitar ambas alteraciones de acuerdo con el modelo “Two hits” de Knudson, siendo el primer impacto la LOH, afectando un alelo, y el segundo impacto el silenciamiento epigenético afectando el segundo alelo. Efectivamente, varios autores han sugerido que la metilación del promotor podría actuar como una “tercera vía” en el modelo de doble impacto de Knudson (Jones *et al.*, 1999; Kuusimanen *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2004). Este resultado ha sido observado en el caso del gen *MLH1* en los tumores colorrectales esporádicos, donde en algunos casos, han sido incluso detectadas mutaciones puntuales junto a la metilación del promotor (Wheeler *et al.*, 1999; Yuen *et al.*, 2002; Poynter *et al.*, 2008) y, también en los casos hereditarios como HNPCC (Esteller *et al.*, 2001b; Kaz *et al.*, 2007; Poynter *et al.*, 2008). En el caso del gen *MSH2*, este resultado ha sido observado en algunos casos HNPCC (Chan *et al.*, 2006), pero no parece que ocurra así en los tumores colorrectales esporádicos desarrollados por la vía mutadora, tal como se desprende de nuestro trabajo.

Por otra parte, en la Figura 50 observamos que 5 de los 6 tumores MSI-H que presentan un solo tipo de alteración en el gen *MSH2* (LOH o metilación) presentan igualmente metilación en el gen *MLH1* (83,3%). Este resultado demuestra que para el desarrollo de los tumores MSI-H es imprescindible la alteración casi completa de los genes con mayor importancia en el sistema MMR: *MLH1* y/o *MSH2*.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la metilación de los genes *MLH1*, *MSH2* y *P16* participa en diferentes etapas de la progresión tumoral a través de la vía mutadora; siendo el gen *MLH1* el principal implicado en este mecanismo, en la aparición de la inestabilidad genómica propia de esta vía, en colaboración con el gen *MSH2*, participando en el mismo fenómeno. La metilación del gen *P16*, por su parte, conlleva a la progresión tumoral y a la aparición de un fenotipo agresivo de los tumores de esta vía. En cuanto a los genes *P15* y *CDHI*, éstos no parecen constituir una diana de metilación en esta vía de tumorigénesis. Sin embargo, cuando el gen *CDHI* sufre un silenciamiento por metilación de su promotor, esto contribuiría a la aparición de metástasis. Por todo ello, el análisis de la metilación de los promotores de *MLH1*, *MSH2* y *P16* podría servir de biomarcador en la tumorigénesis colorrectal. Además, el análisis de la metilación de *P16* podría utilizarse también como un factor pronóstico de los pacientes con estos tumores.

## 2. IMPLICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN *MLH1* EN LA VÍA MUTADORA

En la última década se ha detectado una amplia lista de polimorfismos de base única en los genes MMR. En el gen *MLH1* se han descrito cerca de 300 *SNPs* localizados a lo largo de este gen. La función y la implicación de la mayoría de éstos en el cáncer, o en otras enfermedades, todavía se desconoce. Sin embargo, algunos de estos polimorfismos, han sido analizados y se ha demostrado su capacidad de inducir un riesgo relativo a padecer cáncer colorrectal en los portadores, o de proteger a éstos frente a la enfermedad. En muchos casos se han descrito incluso resultados contradictorios. En este trabajo hemos analizado tres *SNPs* en el gen *MLH1*: *MLH1* 415G>C (D132H; rs28930073), *MLH1* 655A>G (I219V, rs1799977) y *MLH1* 1852-1853 AA>GC (K618A), mediante un estudio caso-control, utilizando las técnicas PCR-RFLP y AS-PCR, con el fin de averiguar su implicación en el desarrollo del cáncer colorrectal, y el riesgo que pueden conferir a los portadores los distintos genotipos, además de valorar su asociación con los factores genéticos y clinicopatológicos de los tumores analizados.

En nuestro estudio no hemos detectado ningún individuo portador del polimorfismo *MLH1* G415C (D132H) ni en pacientes, ni en controles, coincidiendo con otros trabajos llevados a cabo en poblaciones caucásica y norteamericana (Schafmayer *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2005). Sin embargo, en las poblaciones asiática y israelí, la variante *MLH1* G415C (D132H) ha sido detectada con unas frecuencias más altas (Mei *et al.*, 2006; Lipkin *et al.*, 2004). En el primero de estos estudios la variante para *MLH1* G415C ha sido detectada en heterocigosis, con una frecuencia del 8,8 % en los pacientes (14/160) y del 5,3% en los controles (8/150), pero no se observó ninguna asociación entre ella y el riesgo de desarrollar CCR en la población asiática (Mei *et al.*, 2006). En población israelí la variante para *MLH1* G415C ha sido detectada con una frecuencia más baja (~1,3%: 21/1231) en pacientes con tumores colorrectales y que no presentaban inestabilidad de microsatélites. No obstante, este polimorfismo se asociaba con un riesgo elevado de cáncer colorrectal en esa población (OR = 4.6; 95% CI = 1.7-12.3). Además, el alelo variante para *MLH1* G415C se demostró como responsable de una atenuación de la actividad ATPasa de la proteína MLH1, pero sin eliminarla completamente (Lipkin *et al.*, 2004). Estos resultados demuestran que el riesgo de desarrollar el cáncer colorrectal estaría controlado no solamente por la base genética de los pacientes, sino además por la interacción entre estas variantes genéticas y los diferentes factores medio-ambientales, por lo que el polimorfismo *MLH1* G415C sería responsable de conferir un alto riesgo de CCR a los portadores en la población israelí, pero no presentaría asociación con esta enfermedad en otras poblaciones.

El cambio dinucleotídico *MLH1* 1852-1853 AA>GC (K618A) fue descrito como una mutación de sustitución de base (Tannergard *et al.*, 1995) y la variante ha sido detectada en varios trabajos con unas frecuencias bajas (1-3% aproximadamente) en tumores estables o con baja inestabilidad de los microsatélites (Guerrette *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Scartozzi *et al.*, 2002;

Belvederesi *et al.*, 2006). Sin embargo, ha sido asociada con un riesgo elevado de CCR (Liu *et al.*, 1999; Fearnhead *et al.*, 2004), e incluso considerada como una mutación de baja penetrancia en HNPCC (Blasi *et al.*, 2006). En nuestro estudio hemos detectado la variante *MLH1* 1852-1853 AA>GC sólo en heterocigosis y con unas frecuencias muy bajas; siendo la observada en los controles incluso más alta que la de los pacientes (4% (5/125) frente a 0,71% (1/140) respectivamente). Además, ese único caso corresponde a un tumor estable. Nuestro resultado coincide con estudios anteriores, donde la variante en cuestión fue detectada solamente en un paciente HNPCC, sin historia familiar de la enfermedad, mientras que no fue observada en ninguno de los 155 individuos del grupo control, sugiriendo por lo tanto que *MLH1* 1852-1853 AA>GC (K618A) no representa una mutación patológica sino que constituye simplemente una rara variante polimórfica (Belvederesi *et al.*, 2006).

La variante *MLH1* 655A>G (I219V) fue inicialmente descrita igualmente como un polimorfismo raro, sin ninguna implicación en el mecanismo de la carcinogénesis (Liu *et al.*, 1995; Trojan *et al.*, 2002). Posteriormente, al incrementarse los estudios se observó que *MLH1* 655A>G representaba el polimorfismo exónico más frecuente en *MLH1*, así como la variante con la frecuencia de heterocigosis más alta de todos los polimorfismos exónicos en el gen (Tournier *et al.*, 2004). En nuestro trabajo hemos detectado una frecuencia de homocigotos normales AA de 51,2% (64/125), 35,2% (44/125) de heterocigotos AG y 13,6% (17/125) de homocigotos variantes GG, con una frecuencia alélica de 0,69 para el alelo A y de 0,31 para el alelo variante G, en el grupo control. En los pacientes estas frecuencias fueron: 29,3% (41/140) de AA, 51,4% (72/140) de AG y 19,3% (27/140) de GG, mientras que las frecuencias alélicas en este grupo fueron: 0,55 y 0,45 para los alelos A y G respectivamente (Tabla 44 y Figura 63). Estas frecuencias coinciden con las descritas en las poblaciones caucásica y americana (0,4 y 0,6 aproximadamente, para los alelos A y G respectivamente) (Tannergard *et al.*, 1995; Hutter *et al.*, 2000; Tournier *et al.*, 2004; Blasi *et al.*, 2006).

Por otra parte, los análisis de asociación que han sido realizados sobre el polimorfismo *MLH1* 655A>G (I219V) muestran unos resultados contradictorios. En estudios caso-control llevados a cabo en pacientes caucásicos y norteamericanos con cáncer colorrectal no se observó ninguna asociación entre la variante *MLH1* 655A>G y el riesgo a padecer este cáncer (Yu *et al.*, 2006; Berndt *et al.*, 2007; Raptis *et al.*, 2007). Sin embargo, en pacientes con colitis ulcerosa, se observó que presentaban cinco veces más el genotipo homocigoto variante GG en comparación con los individuos sanos (Bagnoli *et al.*, 2004). Igualmente se ha detectado que los portadores del genotipo homocigoto polimórfico GG presentaban casi el triple de riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con los homocigotos normales AA (Listgarten *et al.*, 2004), y algo similar se ha encontrado en leucemia linfoblástica aguda infantil donde se ha referido un riesgo incrementado en los portadores del alelo G combinado con otras variantes (Mathonnet *et al.*, 2003). En nuestros análisis de asociación observamos igualmente que los individuos portadores



del alelo variante G (genotipos AG y GG) presentan más del doble de riesgo a desarrollar CCR en comparación con los homocigotos normales AA (HR: 2,53; 95% IC = 1,53-4,20;  $p < 0,001$ ; Tabla 45). La posición 219 muestra un residuo hidrofóbico altamente conservado (I219) y el cambio aminoacídico I219V es muy improbable que elimine completamente la función de la proteína MLH1, pero puede modularla ligeramente (Hudler *et al.*, 2004; Plotz *et al.*, 2008), lo que explicaría su contribución al riesgo de padecer cancer encontrada en nuestro trabajo y en otros estudios. Finalmente, observamos que los varones portadores del alelo variante G presentan el triple de riesgo a desarrollar esta enfermedad que los varones con el genotipo homocigoto normal AA (HR: 3,19; 95% IC = 1,63-6,22;  $p = 0,001$ ; Tabla 46). En general, se ha observado que los hombres son más propensos a desarrollar tumores colorrectales que las mujeres (McCashland *et al.*, 2001); este hecho se observa especialmente en las poblaciones con mayor tasa de envejecimiento, lo que es el caso de la población española. De hecho, nuestra serie de pacientes, presenta una media de edad de  $67,22 \pm 12,7$  años, y el 89% son mayores de 50 años. No obstante, hasta el momento, no se ha descrito ninguna diferencia entre hombres y mujeres en cuanto a la base molecular de la enfermedad.

Cuando analizamos la distribución de la variante *MLH1* 655A>G entre los tres niveles MSI no encontramos una diferencia estadísticamente significativa, aunque un 94,1% (16/17) de los tumores MSI-L, un 68,8% (11/16) de los tumores MSI-H y un 67,3% (72/107) de los tumores MSS son portadores del alelo variante G (Tabla 48). Estos resultados demuestran que esta variante afectaría al riesgo de desarrollar CCR, pero no tendría ninguna relación con la aparición del fenotipo MSI en los tumores. Este hecho se debe probablemente a que el polimorfismo *MLH1* 655A>G no afectaría a la eficiencia reparadora de la proteína, sino que modificaría la actividad del sistema MMR a largo plazo (Hudler *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006; Raptis *et al.*, 2007). Por otra parte, la causa principal de alteración del gen *MLH1* en los tumores MSI-H desarrollados por la vía mutadora es la metilación de su promotor (Kuismanen *et al.*, 2000; Yuen *et al.*, 2002), por lo que es bastante complicado detectar la intervención de otro factor que podría incrementar la alteración de este gen, y por lo tanto la alteración del sistema MMR, como sería la variante *MLH1* 655A>G.

La mayoría de los tumores portadores del alelo polimórfico G (AG+GG) no presentan recurrencia, ni invasión vascular, ni metástasis (Tabla 47) lo cual es coincidente con lo observado en relación con la supervivencia de los pacientes, donde los portadores del alelo variante G presentan una mejor supervivencia en comparación con los homocigotos normales AA (Tabla 49 y Figura 65B). Por ello, el alelo variante *MLH1* 655A>G, aún siendo un factor de riesgo de CCR, afectaría, sin embargo, positivamente al pronóstico de los pacientes portadores.

En el gen *MLH1* se ha observado una alta heterogeneidad interindividual e interpoblacional (Mitchell *et al.*, 2002). Esto sería la razón por la cual las variantes *MLH1* G415C y *MLH1* 1852-1853 AA>GC se asocian con un alto riesgo de CCR en otras poblaciones, pero no

tienen ninguna relación con esta enfermedad en la población española. Sin embargo, hemos detectado un riesgo elevado de CCR esporádico en asociación con la variante *MLH1* A655G, especialmente en varones, aunque la misma variante podría también tener un efecto positivo en la supervivencia de los pacientes. Estos resultados sugieren que los polimorfismos del gen *MLH1*, dependiendo de su posición, de su combinación y de su repercusión en la proteína, pueden jugar un papel importante en la carcinogénesis colorrectal esporádica. Junto a ello no hay que olvidar las interacciones con otros genes y con los factores medioambientales que pueden contribuir a las diferencias intrapoblacionales e interpoblacionales.

### 3. IMPLICACIÓN DE LOS MUTADORES SECUNDARIOS EN LA VÍA MUTADORA

Los genes *TGFBR2* y *BAX* son dos mutadores secundarios con importantes implicaciones en varios mecanismos celulares. El gen *TGFBR2* está implicado en la diferenciación y la proliferación celulares, así como en la parada del ciclo celular y la apoptosis. La alteración de la vía TGFB constituye un paso significativo en la evolución tumoral. Se ha descrito que en los tumores colorrectales la vía TGFB se podría alterar en ambas vías: La supresora, a través de las mutaciones de los genes *SMAD2* y *SMAD4*, y la mutadora, a través de las mutaciones en el gen *TGFBR2* directamente (Piard *et al.*, 2002). Entre los codones 97 y 153, en el exon 3 de *TGFBR2*, se encuentra una repetición del mononucleótido (A), unas diez veces: A<sub>10</sub>, y entre los codones 510 y 559, en el exon 7 del gen, existe otra repetición, del dinucleótido (GT), unas tres veces: GT<sub>3</sub> (Lu *et al.*, 1995; Akiyama *et al.*, 1996). Por otra parte, el gen proapoptótico *BAX* pertenece a la familia de proteínas BCL2 y juega un papel importante en la eliminación de las células dañadas, ya que es responsable de la activación directa del mecanismo de la apoptosis. En el tercer exon del gen, entre los codones 38 y 41, se encuentra una repetición del mononucleótido (G), unas ocho veces: G<sub>8</sub> (Rampino *et al.*, 1997). Estas repeticiones hacen que ambos genes sean susceptibles a sufrir mutaciones durante la replicación, especialmente cuando el sistema responsable de corregir este tipo de errores, el sistema MMR, es en sí defectuoso. Hemos analizado las regiones que incluyen las repeticiones anteriormente citadas en *TGFBR2* y *BAX* con el fin de averiguar su posible papel, como genes diana, en el mecanismo de la carcinogénesis colorrectal desarrollada a través de la vía mutadora, y su implicación en la aparición de la inestabilidad genómica característica de esta vía, además de su posible papel en el diagnóstico y el pronóstico de los pacientes.

Hemos detectado una tasa de mutaciones en el gen *TGFBR2* del 9,03% (14/155). Esta frecuencia es similar a la observada en un estudio basado en una serie de pacientes con cáncer colorrectal esporádico (10,1%: 47/466) (Samowitz *et al.*, 2001b). En otro estudio, donde se analizaron tumores esporádicos y tumores pertenecientes a individuos HNPCC, las frecuencias observadas fueron del 28% (16/57) y del 79% (30/38) en estos dos grupos respectivamente.



Además se ha observado que todos los tumores que presentaban mutaciones en *TGFBR2* presentaban también una alta inestabilidad de microsatélites (Fujiwara *et al.*, 1998). En nuestro trabajo, hemos encontrado igualmente una alta frecuencia de mutaciones en *TGFBR2* en los tumores MSI-H: 81,2% (13/16), mientras que ningún tumor estable de los 121 analizados presenta esta alteración y tan sólo un tumor MSI-L es portador de la misma (Tabla 13 y Figura 35). Este hecho es coincidente con lo encontrado por otros autores, tanto en tumores esporádicos como en los hereditarios derivados de HNPCC (Parsons *et al.*, 1995; Markowitz *et al.*, 1995; Fujiwara *et al.*, 1998; Young *et al.*, 2001; Duval *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2006).

En el gen *BAX*, hemos detectado una tasa de mutaciones más baja que la observada en *TGFBR2*: 3,87% (6/155), e igualmente más baja que la descrita en otros estudios realizados en series de tumores colorrectales esporádicos (6,1%-13,3%) (Samowitz *et al.*, 2001b; Fujiwara *et al.*, 1998), y en tumores HNPCC, donde las frecuencias se encuentran generalmente por encima del 50% (Fujiwara *et al.*, 1998; Trojan *et al.*, 2004). Por otra parte, igual que *TGFBR2*, las mutaciones en *BAX* han sido relacionadas con los tumores que presentan una alta inestabilidad de microsatélites, esporádicos y derivados de HNPCC, pero también con unas frecuencias menos altas que las del gen *TGFBR2* (de 13 a 50% aproximadamente) (Fujiwara *et al.*, 1998; Duval *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2006). En nuestro estudio todos los tumores portadores de mutaciones en este gen son MSI-H y la frecuencia de mutaciones de *BAX* en este último grupo es del 37,5% (6/16), mientras que ningún tumor MSS o MSI-L presenta esta alteración (Tabla 18 y Figura 39). Por otra parte, los tres tumores que presentan mutaciones en *TGFBR2* y *BAX* conjuntamente son MSI-H. Además, los dieciséis tumores que pertenecen a este último grupo presentan por lo menos uno de los dos genes mutado (Tabla 22). La alta frecuencia de mutaciones en estos dos genes en los tumores MSI-H, además de otras características que presentan los tumores con una alta inestabilidad, como la localización derecha, la diferenciación histológica pobre, la edad temprana de los pacientes portadores de estos tumores, el mejor pronóstico que presentan estos, etc., demuestran que todos los tumores MSI-H comparten las mismas características independientemente del mecanismo molecular implicado en su aparición: mutaciones germinales de los genes MMR en el caso de HNPCC, o somáticas vía silenciamiento epigenético de éstos, como es el caso de los tumores esporádicos analizados en el presente trabajo.

Cuando analizamos las características clinicopatológicas de los tumores portadores de estas alteraciones, observamos que los tumores con el gen *TGFBR2* mutado presentan en su mayoría una localización derecha (26,5% vs. 4,1% en el colon izquierdo; Tabla 12). Desde los primeros trabajos sobre *TGFBR2* se ha observado la relación directa entre las mutaciones en este marcador y la localización proximal en el colon (Markowitz *et al.*, 1995; Akiyama *et al.*, 1996; Iacopetta *et al.*, 1998; Grady *et al.*, 1998; Samowitz *et al.*, 2001b). Este resultado se debe al hecho de que la mayoría de los tumores con esta alteración son MSI-H y por lo tanto con una

localización proximal. Justamente cuando comparamos las mutaciones de *TGFBR2* en los tumores MSI-H con la localización de éstos (Tabla 15), observamos que todos los tumores MSI-H con localización derecha son portadores del gen *TGFBR2* alterado, frente al 50% (3/6) en los tumores distales. Los tumores portadores del gen *BAX* mutado también presentan una localización derecha preferente (8,8% vs. 2,5%), aunque esta diferencia no alcanza significación estadística (Tabla 17), y cuando comparamos la alteración de *BAX* en los tumores MSI-H con la localización de éstos, observamos que todos los tumores MSI-H con mutaciones en este gen presentan una localización proximal (Tabla 20), debido a la misma razón explicada anteriormente.

Por otra parte, hemos observado que los tumores en el estadio B de Dukes presentan frecuentemente mutado el gen *TGFBR2* (17,2%; Tabla 12). Cuando comparamos con los estadios A+B y C+D, observamos que los tumores en un estadio temprano del desarrollo A+B presentan más mutaciones en este mismo gen que los tumores en el estadio tardío C+D (14,5% vs. 4,7%; Tabla 12). Los tumores MSI-H en el estadio B de Dukes presentan igualmente mutado el gen *TGFBR2* (100%; Tabla 15). Sin embargo, este no es el caso de los tumores portadores de alteraciones en el gen *BAX*. Estos tumores se encuentran en su mayoría en un estadio de desarrollo más avanzado (D de Dukes: 10,3%), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 17). Los tumores MSI-H con el gen *BAX* mutado, por su parte, se encuentran igualmente en un estadio de desarrollo más avanzado (C y D de Dukes: 80% y 100% respectivamente, aunque en este último caso hay sólo un tumor; Tabla 20). Nuestros resultados concuerdan con lo observado en estudios anteriores y confirman que la alteración del gen *TGFBR2* es un acontecimiento temprano en la carcinogénesis colorrectal (Akiyama *et al.*, 1996; Grady *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 2006), mientras que la del gen *BAX* ocurre en unos estadios más avanzados del desarrollo tumoral (Ionov *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2006). Por otra parte, los tumores portadores de alteraciones en *BAX* o en *TGFBR2* muestran en su mayoría una diferenciación histológica pobre (38,5% en el caso de *TGFBR2*; Tabla 12 y 23,1% en el caso de *BAX*; Tabla 17), y esta diferencia se incrementa cuando comparamos con los tumores MSI-H (100% en ambos genes; Tablas 15 y 20 respectivamente). Esta característica ha sido referida en algunos estudios anteriores (Iacopetta *et al.*, 1998) y demuestra el papel importante que juega la alteración de ambos genes en la pérdida de diferenciación de las células tumorales y, por lo tanto, su importante implicación en la progresión y el desarrollo tumoral. Por otro lado, el gen *TGFBR2* actúa como un potente inhibidor del crecimiento celular en las células normales, por lo que en las células donde la expresión de este gen se ve alterada, como las tumorales, se suelen observar características de la progresión tumoral como el crecimiento, la invasión de otros tejidos, la metástasis y también la angiogénesis (Blobe *et al.*, 2000; Massagué, 2008), lo cual explicaría el hecho de que los tumores de nuestra serie portadores del gen *TGFBR2* alterado presenten frecuentemente invasión vascular a diferencia de los tumores sin dicha alteración (21,7% vs. 6,8%; Tabla 12). El gen *BAX*, sin embargo, no parece influir en esta característica (Tabla 17).

Estos resultados demuestran que estos dos mutadores secundarios, *BAX* y *TGFBR2*, afectarían a la progresión tumoral de maneras distintas: induciendo la pérdida de la diferenciación celular cuando uno de los dos está mutado, o induciendo la invasión vascular del tumor cuando el gen mutado es *TGFBR2*.

El análisis de la supervivencia de los pacientes en función de la alteración de los genes *BAX* y *TGFBR2* ha revelado tendencias contrapuestas para estos dos marcadores. Así, los pacientes portadores de mutaciones en el gen *BAX* presentan una peor supervivencia en comparación con los individuos sin esta alteración (Tabla 19 y Figura 40), y los pacientes portadores del gen *TGFBR2* alterado muestran una mejor supervivencia frente a los pacientes con el gen normal (Tabla 14 y Figura 36), aunque en ningún caso las diferencias encontradas alcanzaron la significación estadística. Esto se debe, probablemente, al reducido número de pacientes con el gen alterado en ambos casos (6 pacientes frente a 149 en el caso de *BAX*, y 14 pacientes frente a 141 en el caso de *TGFBR2*). La mejor supervivencia de los pacientes con *TGFBR2* mutado ha sido anteriormente observada (Iacopetta *et al.*, 1998). Además, de modo similar a lo encontrado por nosotros había igualmente un reducido número de individuos con *TGFBR2* mutado frente a los individuos sin mutación (29 vs. 151). No obstante, cuando analizamos la supervivencia de los pacientes con tumores MSI-H y mutaciones en *BAX* o *TGFBR2* observamos que los portadores de estas alteraciones presentan una peor supervivencia en comparación con los pacientes sin la misma (Figuras 37 y 41 para *TGFBR2* y *BAX* respectivamente) y, en ambos casos las diferencias sí son estadísticamente significativas. Por lo tanto, las mutaciones en *TGFBR2* o *BAX* se podrían considerar como dos factores pronósticos independientes de baja supervivencia en los pacientes portadores de tumores colorrectales esporádicos con una alta inestabilidad de microsatélites. En algunos estudios anteriores se han observado también estas asociaciones. Así, pacientes con tumores colorrectales o gástricos inestables y con mutaciones en *BAX* presentaban una peor supervivencia frente a los pacientes con el gen *BAX* normal (Ionov *et al.*, 2000). Sin embargo, diversos estudios han descrito mejoras en la supervivencia de los pacientes con tumores MSI-H y mutaciones en *TGFBR2* sólo, o en combinación con las mutaciones en el gen *BAX* (Watanabe *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2006), aunque el primero de estos estudios incluía únicamente pacientes que habían recibido tratamiento de quimioterapia. La explicación exacta a este hecho todavía no ha sido encontrada. Sin embargo, se ha propuesto que la alteración de la vía TGFB como consecuencia de las mutaciones del gen del receptor de tipo II del factor TGFB causaría una inhibición de las señales que llegan a este receptor, como las responsables de la parada del ciclo celular o las proapoptóticas, lo que afectaría finalmente de manera positiva a la supervivencia (Jung *et al.*, 2006). Por el contrario, otras investigaciones previas no han encontrado ninguna diferencia en cuanto a la supervivencia de los pacientes con y sin mutaciones en estos dos mutadores secundarios (Samowitz *et al.*, 2002).

*TGFBR2* constituye el primer gen diana identificado en los tumores colorrectales con inestabilidad de microsatélites (Markowitz *et al.*, 1995; Parsons *et al.*, 1995). Desde entonces se han descrito más genes con esta característica, como el gen proapoptótico *BAX* (Rampino *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1998). Nuestros resultados demuestran que las alteraciones en ambos genes constituyen un paso significativo en el desarrollo de los tumores colorrectales por la vía mutadora, así como en el pronóstico negativo de los pacientes portadores de las mismas, confirmando que *TGFBR2* y *BAX* representan dos importantes genes diana en la inestabilidad genómica observada en los tumores colorrectales esporádicos MSI-H (Akiyama *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2002).

#### **4. CARACTERÍSTICAS DE LOS TUMORES MSI DESARROLLADOS POR LA VÍA MUTADORA**

La inestabilidad de los microsatélites aparece en las células tumorales desarrolladas por la vía mutadora como resultado de la alteración de uno de los sistemas responsables del mantenimiento de su integridad, que es el sistema MMR. Esta inestabilidad caracteriza aproximadamente el 80% de los tumores HNPCC y del 15 al 20% de los tumores esporádicos, y ha sido detectada en tumores de mama, de endometrio y de estómago (Risinger *et al.*, 1993; Rhyu *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 2000). En "*The International Workshop on Microsatellite Instability and RER Phenotypes in Cancer Detection and Familial Predisposition*", aparte de establecer los tres niveles MSI: MSS, MSI-L y MSI-H, se destacó la importancia de su análisis, permitiendo uniformar los criterios de clasificación de los tumores colorrectales, así como de mejorar el reconocimiento de las familias HNPCC (Boland *et al.*, 1998). Por otra parte, los tumores colorrectales muestran unas características genéticas y clinicopatológicas diferentes en función del grado de inestabilidad de microsatélites que presentan.

En el presente trabajo hemos analizado la inestabilidad de los microsatélites en los ciento cincuenta y cinco tumores colorrectales esporádicos de nuestra serie con el fin de establecer el perfil genético y clinicopatológico de éstos, así como la implicación que pueda tener esta inestabilidad en la supervivencia de los pacientes.

Hemos detectado una tasa del 10,3% (16/155) de tumores MSI-H, 11,6% (18/155) de tumores MSI-L y 78,1% (121/155) de tumores estables MSS (Figura 30). La frecuencia detectada en nuestro estudio de los tumores MSI-H se corresponde con la descrita en anteriores trabajos (de 10 a 15% aproximadamente) (Feeley *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001; Laiho *et al.*, 2002; Greenson *et al.*, 2003). Por otra parte, nuestra frecuencia de tumores MSI-L es del 11,6%. La comparación de esta frecuencia con lo encontrado en otras series en esta ocasión resulta más complicada, porque no existen bastantes datos en la literatura para contrastar este resultado, puesto que muchos estudios excluyen los tumores MSI-L de su trabajo por la polémica

en torno a la existencia de esta clase de tumores, o los consideran como estables. Además en varios de estos trabajos se ha utilizado un número mayor de microsatélites para poder detectar este grupo de tumores, y las frecuencias encontradas son muy variables. Así, en estudios basados en series de tumores colorrectales esporádicos, donde se ha analizado el panel de los microsatélites recomendados, las frecuencias encontradas de los tumores MSI-L fue del 3% al 34,14% según las series (Gryfe *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001; Asaka *et al.*, 2009; Rudzki *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2003). En los casos de baja frecuencia, en algunos trabajos se ha eliminado el grupo de tumores de baja inestabilidad, introduciéndolos dentro del grupo de los tumores estables (Gryfe *et al.*, 2000). Sin embargo, en un trabajo donde se analizó un panel de 377 microsatélites en una serie de 90 tumores colorrectales que presentaban el marcador BAT26 estable, con el fin de descartar los tumores MSI-H y poder establecer el verdadero nivel de inestabilidad de los tumores MSI-L, se detectó una tasa del 79% de tumores MSI-L (Laiho *et al.*, 2002). No obstante, tal como se ha discutido en otros apartados de esta discusión, numerosos datos apoyan que esta categoría de tumores tiene una entidad propia y puede considerarse como una clase de tumores independiente (Oliart *et al.*, 2006).

El 56,8% (88/155) de nuestra serie son varones y el 43,2% (67/155) son mujeres. Cuando comparamos con el nivel de inestabilidad de los microsatélites, observamos que los tumores MSS, MSI-L y MSI-H están uniformemente distribuidos entre ambos sexos, no preciándose ninguna diferencia estadísticamente significativa (Tabla 9). En algunos trabajos se relacionó la aparición de los tumores MSI-H con el sexo femenino (Ward *et al.*, 2001; Samowitz *et al.*, 2001a). Sin embargo, en otros, como ocurre el presente estudio, no se ha observado ninguna relación (Feeley *et al.*, 1999; Gryfe *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2003).

La media de edad de estos pacientes es del  $67,22 \pm 12,7$  años, con un rango de 16 a 93 años. El paciente de 16 años representa el individuo de menor edad de la serie, el siguiente paciente tiene 32 años. A pesar de esta diferencia de edad, ambos casos sugieren la existencia de algún componente familiar, puesto que la edad avanzada es uno de los factores determinantes en la aparición de los tumores esporádicos. En España, se calcula que aproximadamente el 92,5% de los casos de cáncer colorrectal aparece en pacientes mayores de 50 años (Viñes *et al.*, 2003). Justamente, al dividir la serie en 2 grupos de edad (mayores y menores de 50 años), observamos que el 89% (138/155) son mayores de 50 años, mientras que sólo el 10,9% (17/155) son menores de 50 años. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las medias de edad entre los tres niveles MSI, ni tampoco al comparar éstos con los dos grupos (mayores y menores de 50 años), aunque observamos que la frecuencia de los tumores MSI-H es más alta en los pacientes menores de 50 años (17,6% frente a 9,4% en los mayores de 50 años; Tabla 9). Este resultado ha sido observado previamente (Johannsdottir *et al.*, 1999; Gryfe *et al.*, 2000; Samowitz *et al.*, 2001a). No obstante, en el trabajo de Gryfe la serie estudiada estaba restringida a pacientes portadores de tumores colorrectales esporádicos, menores de 50 años de edad (Gryfe *et al.*, 2000).

Sin embargo, este grupo de pacientes representa, generalmente, menos del 10% de los pacientes con cáncer colorrectal, por lo que el resultado encontrado no puede reflejar el comportamiento de la población general. Por otra parte, en el trabajo de Samowitz, la serie estudiada consistía en 1026 pacientes con tumores colorrectales esporádicos, y se observó una alta frecuencia de tumores MSI-H en el grupo de los pacientes menores de 50 años, aunque también en el grupo de los pacientes de 71 a 79 años (Samowitz *et al.*, 2001a). Aunque en ningún caso se ha dado una explicación satisfactoria a la asociación de tumores MSI-H con pacientes de menor edad, es posible que en todas las series analizadas, incluida la nuestra, dentro de ese grupo de edad se encuentren algunos pacientes HNPCC que no hayan sido detectados. La localización preferencial derecha encontrada en la serie para estos tumores con alta inestabilidad de microsatélites, que será discutida a continuación, también serviría de apoyo a esta apreciación.

Por otro lado, hemos observado que el 78,7% (122/155) de los tumores analizados está situado en el colon izquierdo, frente al 21,3% (33/155) en el colon derecho. El origen embrionario diferente de las dos secciones del colon, distal y proximal, hace que los tumores localizados en un lado u otro tengan unas características distintas. Una de estas características es el nivel de MSI (Bufill, 1990; Lindblom, 2001; Iacopetta, 2002). Así, observamos que el 62,5% (10/16) de los tumores MSI-H de nuestra serie presenta una localización derecha, mientras que el 86% (104/121) de los tumores MSS presenta una localización izquierda y el 66,7% (12/18) de los tumores MSI-L presenta igualmente una localización izquierda (Tabla 9). La localización derecha preferente de los tumores MSI-H, igual que la localización izquierda de los tumores MSS han sido descritas con anterioridad (Thibodeau *et al.*, 1993; Boland *et al.*, 1998; Johannsdottir *et al.*, 1999; Gryfe *et al.*, 2000; Samowitz *et al.*, 2001a; Ward *et al.*, 2001; Raut *et al.*, 2004; Söreide *et al.*, 2006). Aunque la causa exacta de tal distribución sigue sin conocerse totalmente, tal como ha sido mencionado anteriormente, la inclusión de algunos pacientes HNPCC indetectados puede contribuir a este sesgo. En cuanto a los tumores MSI-L de nuestra serie, éstos comparten la localización izquierda con los tumores MSS. Este resultado ha sido anteriormente observado (Ward *et al.*, 2001; Asaka *et al.*, 2009; Rudzki *et al.*, 2003; Oliart *et al.*, 2006) y se debe al hecho de que los tumores MSI-L se desarrollan a través de la vía mutadora intermedia, y muestran unas características propias de los tumores MSI-H y otras características de los tumores estables, como la localización izquierda en este caso (Oliart *et al.*, 2006).

Al analizar el estadio de desarrollo de los tumores de la presente serie, observamos que el 36,77% (57/155) de los tumores está en el estadio B de Dukes, el 37,41% (58/155) en el estadio C, el 18,7% (29/155) en el estadio D, y sólo el 7,1% (11/155) está en el estadio A. Este hecho puede deberse a que las primeras etapas del desarrollo de los tumores colorrectales no producen síntomas, por lo que el diagnóstico de la enfermedad se realiza, en general, en unos estadios más avanzados, como el estadio B y el C. En cuanto a la baja frecuencia observada en el estadio D, en comparación con los estadios B y C, ésta se puede explicar por el hecho de que el estadio D de



Dukes es muy avanzado en el desarrollo, por lo que el paciente, en general en esta etapa, ya tiene que haber manifestado alguna molestia o cambio en sus hábitos gastro-intestinales. Por otra parte, este resultado refleja la importancia de la detección precoz de los tumores colorrectales, puesto que cuando se detectan éstos en los estadios tempranos del desarrollo (A o B de Dukes), los pacientes muestran, en general, una supervivencia superior al 85% a los 5 años (Gómez-Dominguez *et al.*, 2006; Nascimbeni *et al.*, 2008). Cuando estratificamos por grupos MSI, observamos que todos los tumores en el estadio A son estables, y cuando vemos la distribución de los tumores MSS en función de su estadio de Dukes, observamos que los tumores se distribuyen, de mayor a menor porcentaje, en los estadios C, B, D y A de Dukes (49/121: 40,5%; 38/121: 31,4%; 23/121: 19% y 11/121: 9,1%, respectivamente). Además la mayoría de los tumores detectados en el estadio D son MSS (79,3%), en comparación con los tumores MSI-L y MSI-H (17,2% y 3,4% respectivamente). Los tumores MSI-H por su parte, están en su mayoría en el estadio B de Dukes (10/16: 62,5%), en comparación con 31,25% (5/16) y 6,25% (1/16) en los estadios C y D respectivamente, lo cual indicaría un desarrollo más lento de los tumores MSI-H, aunque la diferencia no alcance significación estadística (Tabla 9). El desarrollo patológico más lento de los tumores inestables sin alcanzar la fase de metastatizarse (estadio D de Dukes) ha sido referida previamente (Gryfe *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001) y, confirmaría el hecho de que los tumores MSI-H suelen presentar un mejor pronóstico, y los pacientes portadores de los mismos una mejor supervivencia, tal como ha sido descrito en trabajos anteriores (Thibodeau *et al.*, 1993; Boland *et al.*, 1998; Gryfe *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001; Raut *et al.*, 2004).

La mayoría de los tumores analizados en el presente trabajo presentan una diferenciación histológica buena y moderada (45,16% y 45,8% respectivamente), frente al 8,4% que es pobre. Esta tendencia se sigue para los tumores MSS y para los MSI-L, al estratificar por grupos MSI. Así, los tumores MSS, son bien o moderadamente diferenciados (46,66% y 47,5% respectivamente), igual que los tumores MSI-L (44,44% y 50% respectivamente), mientras que los tumores MSI-H muestran frecuentemente una diferenciación moderada o pobre (31,25%: 5/16, en ambos casos; Tabla 9). Esta asociación de los tumores inestables con la diferenciación histológica pobre ha sido referida previamente (Gryfe *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001; Samowitz *et al.*, 2001a; Mori *et al.*, 2003), aunque esta característica constituye una paradoja en los tumores MSI-H, puesto que los tumores pobremente diferenciados son aquellos que presentan unas células que han perdido la semejanza histológica con el tejido donde se originó el tumor. Estos tumores presentan unas células pleomórficas, con una escasa o nula formación de glándulas, y demuestran el avanzado estadio del desarrollo tumoral. No obstante los tumores MSI-H suelen presentar un desarrollo patológico más lento y se asocian habitualmente con un mejor pronóstico y una mejor supervivencia de los pacientes, tal como se mencionó anteriormente. Una posible explicación a este hecho sería que, los tumores MSI-H, al presentar un desarrollo patológico más lento tendrían

más tiempo de acumular alteraciones y por consiguiente podrían presentar más diferencias histológicas respecto a las células originales.

Las mutaciones en el oncogen *KRAS2* han sido detectadas en los tumores colorrectales con una frecuencia del 30 al 50% aproximadamente, y se ha descrito que alrededor del 90% de ellas ocurren en los codones 12 y 13, en el exon 1 del gen (Anderson *et al.*, 1992; Downward, 2003; Russo *et al.*, 2005a). En el presente estudio, se analizó el codon 12 del gen *KRAS2* en 77 individuos y se detectó una frecuencia de mutaciones del 35,1% (27/77). Esta frecuencia concuerda con lo encontrado en estudios anteriores realizados en otras series de tumores colorrectales esporádicos (Fujiwara *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2002; Brink *et al.*, 2003). Cuando comparamos con los tres niveles MSI, no observamos diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10), aunque existe un sólo tumor MSI-H que presenta esta alteración (3,7%), frente a 77,8% y 18,5% de los tumores MSS y MSI-L portadores de la misma, respectivamente (Tabla 10). Por otra parte, se ha descrito que el gen *TP53* se encuentra alterado en aproximadamente el 40% al 50% de los tumores colorrectales. La mayoría de estas alteraciones (~80%) son en forma de mutaciones puntuales, mientras que del 10 al 15% son inserciones y deleciones generando una proteína no-funcional (Vogelstein *et al.*, 2000; Soussi *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2005b). Hemos analizado la LOH de *TP53* en 146 individuos y hemos observado que el 28,76% de ellos (42/146) presenta esta alteración. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa al comparar con los tres niveles MSI, y sólo tres tumores MSI-H (7,1%) son portadores de la misma, en comparación con 81% de los tumores estables y 11,9% de los tumores MSI-L (Tabla 10). La baja frecuencia de mutaciones en *TP53* y *KRAS2* en los tumores colorrectales esporádicos con inestabilidad de microsatélites, en comparación con los estables, ha sido observada en otros estudios realizados en este tipo de tumores (Fujiwara *et al.*, 1998; Samowitz *et al.*, 2001b; Chang *et al.*, 2006), y podría ser atribuida a la heterogeneidad, ya referida, de la carcinogénesis colorrectal, puesto que los tumores con inestabilidad de microsatélites se desarrollan a través de la vía mutadora donde está implicado otro tipo de genes, como los genes del sistema MMR y los mutadores secundarios (Smith *et al.*, 2002; Söreide *et al.*, 2006), tal como ha sido demostrado a lo largo de nuestro estudio. Grady propuso que la baja frecuencia de las mutaciones en el gen *TP53* en los tumores MSI-H podría estar compensada por la alta frecuencia de mutaciones en el gen proapoptótico *BAX*, puesto que ambas alteraciones llevan la célula tumoral a escapar de la muerte celular programada (Grady, 2004). Justamente cuando analizamos en nuestra serie las mutaciones del gen *BAX*, detectamos un 37,5% (6/16) de éstas en los tumores MSI-H (Tabla 18), frente a sólo 18,75% (3/16) de LOH en *TP53*, en los mismos (Tabla 10).

En el presente trabajo, hemos analizado la LOH del gen *APC* en 152 pacientes y hemos observado esta alteración en el 10,52% de éstos (16/152). Se ha indicado que la alteración más temprana detectada en la carcinogénesis colorrectal es la del gen *APC*. En tumores colorrectales esporádicos las frecuencias descritas de mutaciones en este gen oscilan entre el 20 y el 70%



(Chung, 2000; Fearnhead *et al.*, 2001; Lüchtenborg *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003c; Aoki *et al.*, 2007), y estas frecuencias son aún más altas cuando se trata de líneas celulares de CRC (Rowan *et al.*, 2000; Gayet *et al.*, 2001). Sin embargo, estas frecuencias varían en función de los tipos de alteraciones analizadas y del estatus MSI de los tumores, de manera que cuando únicamente se analiza la LOH del gen, las frecuencias encontradas en investigaciones precedentes en muchos casos son menores y aproximadas a lo encontrado por nosotros (Young *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003c). En nuestro estudio las alteraciones del gen *APC* han sido analizadas mediante LOH, y no se han determinado mutaciones puntuales, lo cual explicaría las aparentes discrepancias con algunos de los resultados previamente observados. Precisamente, en investigaciones donde se compara LOH con mutaciones puntuales dentro del gen, en relación con la carcinogénesis colorrectal, confirman este hecho. Así, en un trabajo realizado en pacientes con cáncer colorrectal esporádico se observó una LOH del 21,2% en los carcinomas (7/33) y del 15% en los adenomas analizados (6/40), mientras que el análisis de las mutaciones puntuales, localizadas entre los exones 1 y 14 de *APC*, reveló una tasa del 70% y del 45% en los carcinomas y adenomas respectivamente (Kim *et al.*, 2003c).

Cuando comparamos dentro de los niveles MSI, hemos observado que los tumores MSI-H presentan una frecuencia de LOH del 33,3% (5/15), frente al 11,1% (2/18) y 7,6% (9/119) en los tumores MSI-L y MSS respectivamente (Tabla 10). Esta distribución sería contraria a trabajos previos donde las mutaciones en *APC* han sido detectadas con unas frecuencias más altas en los tumores estables y de baja inestabilidad frente a los tumores MSI-H (Konishi *et al.*, 1996; Jass *et al.*, 1999b). Incluso se ha llegado a describir la ausencia de asociación en tumores MSI-H esporádicos con la LOH en *APC* (0/20) (Young *et al.*, 2001). Todo ello apoyaría el hecho de que las mutaciones en *APC* caracterizan especialmente los tumores con CIN desarrollados por la vía supresora, tal como ha sido descrito por algunos autores (Raut *et al.*, 2004; Söreide *et al.*, 2006). No obstante, otros estudios previos han descrito porcentajes mayores de alteraciones del gen *APC* en tumores MSI-H frente a los estables, indicándose que la inactivación de *APC* no sería un evento únicamente asociado a la vía supresora, e incluso muchas mutaciones en *APC* podrían ser una consecuencia de los defectos en el sistema MMR (Huang *et al.*, 1996). Además, estas frecuencias son aún mayores en estadios avanzados del desarrollo tumoral en comparación con los estadios tempranos, demostrando que las alteraciones del gen *APC* se pueden acumular a lo largo del proceso de la carcinogénesis (Zauber *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2003c). Por otra parte, estos resultados demostrarían igualmente que las alteraciones genéticas que tienen lugar durante el proceso de la carcinogénesis colorrectal no siguen un modelo lineal, sino que su orden varía en función de los pacientes y de los tejidos afectados (Rowan *et al.*, 2005).

La alteración de los genes MMR está estrechamente asociada con los tumores colorrectales desarrollados a través de la vía mutadora. En HNPCC, estas alteraciones consisten en mutaciones germinales ocurriendo especialmente en *MLH1* y *MSH2* con una frecuencia de

hasta el 90%, y en *MSH6* con una frecuencia del 10% aproximadamente (Lynch *et al.*, 2003; De la Chapelle, 2004; Lynch *et al.*, 2006). En los tumores colorrectales esporádicos, estas alteraciones son somáticas, consistiendo en la mayoría de los casos en un silenciamiento epigenético de los genes MMR, principalmente *MLH1*, tal como ha sido demostrado en el primer apartado de esta discusión y, en algunos casos también, en pérdidas de heterocigosidad (Tomlinson *et al.*, 1996b; Kane *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1998; Herman *et al.*, 1998; Toyota *et al.*, 1999; Kuusmanen *et al.*, 2000; Yuen *et al.*, 2002). En nuestra serie, hemos analizado la LOH del gen *MLH1* en 91 pacientes y hemos detectado ésta con una frecuencia del 8,8% (8/91). Hemos analizado también la LOH del gen *MSH2*, en 150 pacientes, y la hemos observado en el 12% de los casos (18/150). Este resultado es diferente al observado en otros trabajos, puesto que generalmente la LOH del gen *MSH2* se suele observar con menos frecuencia que la del gen *MLH1*. Así, en estudios anteriores realizados en series de tumores colorrectales esporádicos, se observaron unas frecuencias de LOH por encima del 20% en *MLH1*, frente a porcentajes alrededor del 10% de LOH en *MSH2* (Tomlinson *et al.*, 1996b; Chang *et al.*, 2005). Nuestras bajas frecuencias de LOH en *MLH1* en comparación con *MSH2* se podrían atribuir a la base genética diferente de nuestra población estudiada, teniendo especialmente en cuenta la alta heterogeneidad que presentan los genes *MLH1* y *MSH2* del sistema MMR (Mitchell *et al.*, 2002).

Cuando comparamos con los grados MSI, observamos que ningún tumor MSI-H presenta LOH en *MLH1*, mientras que el 10% de los tumores MSS presenta esta alteración, aunque esta comparación no es estadísticamente significativa (Tabla 10). No obstante, observamos que un porcentaje más alto de tumores MSI-H (37,5%) presenta LOH en *MSH2*, frente al porcentaje observado en los tumores MSI-L y MSS (17,6% y 7,7%, respectivamente; Tabla 10). Este resultado se debe al hecho de que el mecanismo principal del silenciamiento de ambos alelos del gen *MLH1* en los tumores MSI-H es la metilación del promotor de éste, mientras que el gen *MSH2* necesitaría los dos tipos de alteraciones, la LOH y la metilación del promotor, para un silenciamiento completo de éste, tal como ha sido explicado en el primer apartado.

A diferencia de otros trabajos donde el grupo de los tumores MSI-H muestra una mejor supervivencia (Wright *et al.*, 2000; Gryfe *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002; Asaka *et al.*, 2009), en nuestra serie no detectamos diferencias estadísticamente significativas ni cuando comparamos las medias de supervivencia entre los 3 grupos MSI, ni en la curva de supervivencia de Kaplan-Meier (Tabla 11 y Figura 33). La alta supervivencia, de los tumores MSI-H, observada en los trabajos anteriormente citados ha sido atribuida a varias causas, como el nivel de desarrollo patológico más atrasado, con una tasa de metástasis reducida, que presentan los tumores MSI-H en comparación con los tumores estables, y también a la edad de los pacientes, aunque en alguno de estos estudios la serie analizada estaba restringida a individuos menores de 50 años de edad (Gryfe *et al.*, 2000). Por otra parte, en varios estudios se observó que los pacientes portadores de mutaciones en el gen *TP53*, o *TP53* y *KRAS2* juntamente, presentaban una supervivencia más

baja en comparación con los pacientes que no presentaban estas alteraciones (González-Aguilera *et al.* 2004; Chang *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2006), por lo que los tumores MSI-H donde no se suele observar este tipo de mutaciones, se asociarían a una mejor supervivencia.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que los tumores colorrectales desarrollados a través de la vía mutadora, presentan una serie de características genéticas y clinicopatológicas propias de dicha vía. Por otra parte, nuestros datos de supervivencia demuestran que el estatus MSI no podría servir como indicador de pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal esporádico.



*CONCLUSIONES*



## CONCLUSIONES

1. Nuestros análisis acerca de la metilación del promotor de los genes MMR, *MLH1* y *MSH2*, y de los genes supresores de tumores *P15*, *P16* y *CDH1* demuestran la importante implicación de la metilación del gen *MSH2* en el mecanismo de la tumorigénesis colorrectal desarrollada por la vía mutadora y confirman el importante papel de la metilación de *MLH1* y *P16* en este mecanismo.
2. La comparación de la metilación en los cinco marcadores analizados con el nivel de inestabilidad tumoral demuestra que existe una relación directa entre ambos fenómenos, no encontrándose evidencias que apoyen la existencia del fenotipo CIMP, tal como lo describieron otros autores.
3. La metilación del promotor de los genes analizados y la alteración de los genes *KRAS2* y *TP53* son dos fenómenos independientes, caracterizando cada uno una vía de tumorigénesis colorrectal distinta, la vía mutadora y la vía supresora respectivamente, a excepción de los tumores de la vía mutadora intermedia que presentan características propias de ambas vías a la vez.
4. La alteración de los mutadores secundarios *BAX* y *TGFBR2* en el grupo de los tumores con una alta inestabilidad de microsatélites, constituye una consecuencia directa y esperada a la alteración de los mutadores primarios, los genes MMR, en la secuencia de la tumorigénesis colorrectal desarrollada por la vía mutadora.
5. El desarrollo de los tumores MSI-H requiere la alteración de los genes con mayor importancia en el sistema MMR: *MLH1* y *MSH2*. Este proceso es distinto en cada gen: En *MLH1*, la metilación del promotor es bialélica induciendo un silenciamiento completo de este, mientras que en *MSH2*, además de la metilación de su promotor, se requiere la LOH que actuaría como el segundo suceso necesario para su completa alteración, de acuerdo con el modelo de doble impacto de Knudson.
6. La metilación del gen *P16*, además de contribuir a la progresión de los tumores colorrectales esporádicos desarrollados por la vía mutadora, es responsable de la aparición de un fenotipo más agresivo en estos tumores, y del peor pronóstico de los pacientes.
7. La metilación de los promotores de *MLH1*, *MSH2* y *P16* podría servir de biomarcador en la tumorigénesis colorrectal. Además el análisis de la metilación de *P16* podría

utilizarse también como un factor de peor pronóstico en los pacientes con estos tumores.

8. El polimorfismo *MLH1* A655G se asocia con un riesgo elevado de cáncer colorrectal en población española, pero no parece estar implicado en la aparición de MSI. Además este riesgo se ve incrementado en los individuos de sexo masculino, lo cual indicaría la importancia de tener en cuenta el sexo del paciente en el análisis de los factores pronósticos y diagnósticos en el cáncer colorrectal.
9. El polimorfismo *MLH1* 655A>G, a pesar de ser un factor de riesgo, afecta positivamente al pronóstico de los pacientes.
10. Los mutadores secundarios *BAX* y *TGFBR2* afectan a la progresión tumoral de maneras distintas: induciendo la pérdida de la diferenciación celular cuando uno de los dos está mutado, o induciendo la invasión vascular del tumor cuando el gen mutado es *TGFBR2*.
11. *BAX* y *TGFBR2* constituyen dos genes diana en el progreso de los tumores colorrectales de la vía mutadora con MSI-H, y sus mutaciones se pueden considerar como factores pronósticos independientes de la baja supervivencia en los pacientes con este tipo de tumores.
12. En nuestros análisis no se aprecian diferencias en la supervivencia entre los tumores pertenecientes a los distintos grupos MSI, por lo que este parámetro no se podría utilizar como indicador de pronóstico de los pacientes con cáncer colorrectal esporádico.



## *BIBLIOGRAFÍA*



## BIBLIOGRAFÍA

**Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al.** Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993. 260(5109):812-6.

**Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, et al.** Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res*. 1994. 54(7):1645-8.

**Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen HJ.** Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer*. 1999. 81(2):214-8.

**AECC:** <http://www.todocancer.com/es>

**Agrawal S, Eng C.** Differential expression of novel naturally occurring splice variants of PTEN and their functional consequences in Cowden syndrome and sporadic breast cancer. *Hum Mol Genet*. 2006. 15(5):777-87.

**Ahmed FE.** Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2004. 22(2):91-147.

**Ahn J, Prives C.** The C-terminus of p53: the more you learn the less you know. *Nat Struct Biol*. 2001. 8(9):730-2.

**Akiyama Y, Iwanaga R, Ishikawa T, Sakamoto K, Nishi N, Nihei Z, Iwama T, Saitoh K, Yuasa Y.** Mutations of the transforming growth factor-beta type II receptor gene are strongly related to sporadic proximal colon carcinomas with microsatellite instability. *Cancer*. 1996. 78(12):2478-84.

**Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y.** Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res*. 1997. 57(18):3920-3.

**Anderson MW, Reynolds SH, You M, Maronpot RM.** Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ Health Perspect*. 1992. 98:13-24.

**Annes JP, Munger JS, Rifkin DB.** Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 2003. 116(Pt 2):217-24.

**Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado JA, Penn LZ, Leber B, Andrews DW.** Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J*. 2005. 24(12):2096-103.

**Aoki K, Taketo MM.** Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci*. 2007. 120(Pt 19):3327-35.

**Arakawa H.** Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2004. 4(12):978-87.

**Araki K, Furuya Y, Kobayashi M, Matsuura K, Ogata T, Isozaki H.** Comparison of mucosal microvasculature between the proximal and distal human colon. *J Electron Microsc* (Tokyo). 1996. 45(3):202-6.

**Armour JAL.** Tandemly repeated minisatellites: generating human genetic diversity via recombinational mechanisms. In: *Human Genome Evolution*. 1996. Edited by: M Jackson, T Strachan, G Dover. Bios Scientific publishers. P: 172-190.

**Asaka S, Arai Y, Nishimura Y, Yamaguchi K, Ishikubo T, Yatsuoka T, Tanaka Y, Akagi K.** Microsatellite instability-low colorectal cancer acquires a KRAS mutation during the progression from Dukes' A to Dukes' B. *Carcinogenesis*. 2009. 30(3):494-9.

**Ashktorab H, Smoot DT, Farzanmehr H, Fidelia-Lambert M, Momen B, Hyland L, Iacozio-Dononue C, Carethers JM, Goel A, Boland CR, Giardiello FM.** Clinicopathological features and microsatellite instability (MSI) in colorectal cancers from African Americans. *Int J Cancer*. 2005. 116(6):914-9.

**Astler VB, Collier FA.** The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*. 1954. 139(6):846-52.

**Azarschab P, Porschen R, Gregor M, Blin N, Holzmann K.** Epigenetic control of the E-cadherin gene (CDH1) by CpG methylation in colectomy samples of patients with ulcerative colitis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002. 35(2):121-6.

**Bagnoli S, Putignano AL, Melean G, Baglioni S, Sestini R, Milla M, d'Albasio G, Genuardi M, Pacini F, Trallori G, Papi L.** Susceptibility to refractory ulcerative colitis is associated with polymorphism in the hMLH1 mismatch repair gene. *Inflamm Bowel Dis*. 2004. 10(6):705-8.

**Balmain A.** Cancer as a complex genetic trait: tumor susceptibility in humans and mouse models. *Cell*. 2002. 108(2):145-52.

**Ban C, Yang W.** Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell*. 1998. 95(4):541-52.

**Bar-Sagi D.** A Ras by any other name. *Mol Cell Biol*. 2001. 21(5):1441-3.

**Belvederesi L, Bianchi F, Loretelli C, Gagliardini D, Galizia E, Bracci R, Rosati S, Bearzi I, Viel A, Cellerino R, Porfiri E.** Assessing the pathogenicity of MLH1 missense mutations in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with clinical, genetic and functional features. *Eur J Hum Genet*. 2006. 14(7):853-9.

**Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, de Vries EG, Hollema H, Karrenbeld A, Buys CH, van der Zee AG, Hofstra RM, Kleibeuker JH.** Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet*. 2002. 70(1):26-37.

**Berndt SI, Platz EA, Fallin MD, Thuita LW, Hoffman SC, Helzlsouer KJ.** Mismatch repair polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2007. 120(7):1548-54.

**Berrino F, Krogh V, Riboli E.** Epidemiology studies on diet and cancer. *Tumori*. 2003. 89(6):581-5.

**Bertario L, Russo A, Sala P, Varesco L, Giarola M, Mondini P, Pierotti M, Spinelli P, Radice P; Hereditary Colorectal Tumor Registry.** Multiple approach to the exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *J Clin Oncol*. 2003. 21(9):1698-707.

**Bertram JS.** The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. 2001. 21(6):167-223.

**Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002. 16(1):6-21.

**Bishop JM.** Oncogenes and proto-oncogenes. *Hosp Pract (Off Ed)*. 1983. 18(8):67-74.

**Bishop JM.** The molecular genetics of cancer. *Science*. 1987. 235(4786):305-11.

**Blackwell LJ, Martik D, Bjornson KP, Bjornson ES, Modrich P.** Nucleotide-promoted release of hMutSalphi from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J Biol Chem*. 1998. 273(48):32055-62.

**Blasi MF, Ventura I, Aquilina G, Degan P, Bertario L, Bassi C, Radice P, Bignami M.** A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. *Cancer Res*. 2006. 66(18):9036-44.

**Blobe GC, Schieman WP, Lodish HF.** Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 2000. 342(18):1350-8.

**Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, et al.** Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*. 1987. 328(6131):614-6.

**Bodmer WF.** The somatic evolution of cancer. The Harveian Oration of 1996. *J R Coll Physicians Lond*. 1997. 31(1):82-9.

**Bodmer WF.** Cancer genetics: colorectal cancer as a model. *J Hum Genet*. 2006. 51(5):391-6.

**Boland CR, Troncale FJ.** Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann Intern Med*. 1984. 100(5):700-1.

**Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S.** A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998. 58(22):5248-57.

**Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP.** p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2005. 19(18):2122-37.

**Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, Smits KM, de Bruïne AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA.** K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2003. 24(4):703-10.

**Broders AC.** The grading of carcinoma. *Minn Med*. 1925. 8: 726-30.

**Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al.** Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*. 1994. 368(6468):258-61.

**Bufill JA.** Colorectal cancer: evidence for distinct genetic categories based on proximal or distal tumor location. *Ann Intern Med*. 1990. 113(10):779-88.

**Burri N, Shaw P, Bouzourene H, Sordat I, Sordat B, Gillet M, Schorderet D, Bosman FT, Chaubert P.** Methylation silencing and mutations of the p14ARF and p16INK4a genes in colon cancer. *Lab Invest*. 2001. 81(2):217-29.

**Cabrera CM, López-Nevot MA.** APC and chromosome instability in colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig*. 2005. 97(10):738-43.

**Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B.** Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*. 1998. 392(6673):300-3.

**Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR.** CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer*. 2006. 6:48.

**Calland JF, Adams RB, DePrince K, Foley EF, Powell SM.** Genetic syndromes and genetic tests in colorectal cancer. *Semin Gastrointest Dis*. 2000. 11(4):207-18.

**Campbell WJ, Spence RA, Parks TG.** Familial adenomatous polyposis. *Br J Surg*. 1994. 81(12):1722-33.

**Cancer incidence in five continents.** Volume VIII. IARC Sci Publ. 2002. (155):1-781.

**Cánepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, Ogara MF.** INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life*. 2007. 59(7):419-26.

**Cannavo E, Marra G, Sabates-Bellver J, Menigatti M, Lipkin SM, Fischer F, Cejka P, Jiricny J.** Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res*. 2005. 65(23):10759-66.

**Carta C, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A, Digilio C, Palleschi A, Pizzuti A, Grammatico P, Zampino G, Dallapiccola B, Gelb BD, Tartaglia M.** Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet.* 2006. 79(1):129-35.

**Chan AO, Soliman AS, Zhang Q, Rashid A, Bedeir A, Houlihan PS, Mokhtar N, Al-Masri N, Ozbek U, Yaghan R, Kandilci A, Omar S, Kapran Y, Dizdaroglu F, Bondy ML, Amos CI, Issa JP, Levin B, Hamilton SR.** Differing DNA methylation patterns and gene mutation frequencies in colorectal carcinomas from Middle Eastern countries. *Clin Cancer Res.* 2005. 11(23):8281-7.

**Chan TL, Yuen ST, Kong CK, Chan YW, Chan AS, Ng WF, Tsui WY, Lo MW, Tam WY, Li VS, Leung SY.** Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006. 38(10):1178-83.

**Chang SC, Lin JK, Lin TC, Liang WY.** Loss of heterozygosity: an independent prognostic factor of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2005. 11(6):778-84.

**Chang SC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AF, Chi CW.** Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2006. 118(7):1721-7.

**Chen RH, Ebner R, Derynck R.** Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF-beta activities. *Science.* 1993. 260: 1335-1338.

**Cheng CW, Wu PE, Yu JC, Huang CS, Yue CT, Wu CW, Shen CY.** Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene.* 2001. 20(29):3814-23.

**Cheng L, Lai MD.** Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2003. 9(12):2642-9.

**Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR.** Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ.* 2006. 13(8):1396-402.

**Cho E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS, Wu K, Chan AT, Zeisel SH, Giovannucci EL.** Dietary choline and betaine and the risk of distal colorectal adenoma in women. *J Natl Cancer Inst.* 2007. 99(16):1224-31.

**Choi SW, Lee KJ, Bae YA, Min KO, Kwon MS, Kim KM, Rhyu MG.** Genetic classification of colorectal cancer based on chromosomal loss and microsatellite instability predicts survival. *Clin Cancer Res.* 2002. 8(7):2311-22.

**Chung DC.** The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology.* 2000. 119(3):854-65.

**Chung WB, Hong SH, Kim JA, Sohn YK, Kim BW, Kim JW.** Hypermethylation of tumor-related genes in genitourinary cancer cell lines. *J Korean Med Sci.* 2001. 16(6):756-61.

**Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A.** The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest.* 2002. 109(8):987-91.

**Crespo P, León J.** Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci.* 2000. 57(11):1613-36.

**Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN.** Hypermethylation of hMLH1 promoter in colon cancer microsatellite instability. *Cancer res.* 1998. 58(15): 3455-60.

**De la Chapelle A.** Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004. 4(10):769-80.

**de Vogel S, Weijenberg MP, Herman JG, Wouters KA, de Goeij AF, van den Brandt PA, de Bruïne AP, van Engeland M.** MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. *Ann Oncol.* 2009. 20(7):1216-22.

**Denoix PF.** French Ministry of Public: Heahh. National Institute of Hygiene, monograph 4, Paris, 1954.

**Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM.** Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982. 79(11):3637-40.

**Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E, Armengol M, Sijmons RH, Kleibeuker JH, Seruca R, Aaltonen LA, Imai K, Yamamoto H, Schwartz S Jr, Hofstra RM.** BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene.* 2005. 24(24):3995-8.

**Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Muñoz C, Chacón I, Sanchez R, Carballido J, Colás A, España P, Bonilla F.** Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mutat Res.* 2003. 530(1-2):9-17.

**Downward J.** Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003. 3(1):11-22.

**Dragani TA, Canzian F, Pierotti MA.** A polygenic model of inherited predisposition to cancer. *FASEB J.* 1996. 10(8):865-70.

**Dukes CE.** The classification of cancer of the rectum. *J Pathol.* 1932. 35: 323-32.

**Dunlop MG; British Society for Gastroenterology; Association of Coloproctology for Great Britain and Ireland.** Guidance on gastrointestinal surveillance for hereditary non-polyposis colorectal cancer, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis, and Peutz-Jeghers syndrome. *Gut.* 2002. 51 Suppl 5:V21-7.

**Duval A, Hamelin R.** Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* 2002. 62(9):2447-54.

**Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, Peters JH, DeMeester SR, DeMeester TR, Skinner KA, Laird PW.** Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2001. 61(8):3410-8.

**Edelmann W, Umar A, Yang K, Heyer J, Kucherlapati M, Lia M, Kneitz B, Avdievich E, Fan K, Wong E, Crouse G, Kunkel T, Lipkin M, Kolodner RD, Kucherlapati R.** The DNA mismatch repair genes Msh3 and Msh6 cooperate in intestinal tumor suppression. *Cancer Res.* 2000. 60(4):803-7.

**Eeles RA.** Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.* 1995. 25:101-24.

**Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B.** Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet.* 2000. 355(9217):1745-50.

**Eshleman JR, Lang EZ, Bowerfind GK, Parsons R, Vogelstein B, Willson JK, Veigl ML, Sedwick WD, Markowitz SD.** Increased mutation rate at the hprt locus accompanies microsatellite instability in colon cancer. *Oncogene.* 1995. 10(1):33-7.

**Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG.** A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001(a). 61(8):3225-9.

**Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaurs-Barrière C, Bignon YJ, Ramus S, Benitez J, Caldes T, Akiyama Y, Yuasa Y, Launonen V, Canal MJ, Rodriguez R, Capella G, Peinado MA, Borg A, Aaltonen LA, Ponder BA, Baylin SB, Herman JG.** DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet.* 2001(b). 10(26):3001-7.

**Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello E, Mangues R, Germà JR, Herman JG, Capellà G, Peinado MA.** K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2001(c). 19(2):299-304.

**Fang JY, Cheng ZH, Chen YX, Lu R, Yang L, Zhu HY, Lu LG.** Expression of Dnmt1, demethylase, MeCP2 and methylation of tumor-related genes in human gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2004. 10(23):3394-8.

**Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF.** The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 2001. 10(7):721-33.

**Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF.** Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull.* 2002. 64:27-43.

**Fearnhead NS, Wilding JL, Winney B, Tonks S, Bartlett S, Bicknell DC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF.** Multiple rare variants in different genes account for multifactorial inherited susceptibility to colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. 101(45):15992-7.

**Fearon ER, Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990(a). 61(5):759-67.

**Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al.** Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science.* 1990(b). 247(4938):49-56.

**Fearon ER.** Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science.* 1997. 278(5340):1043-50.

**Feeley KM, Fullard JF, Heneghan MA, Smith T, Maher M, Murphy RP, O'Gorman TA.** Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma is not an indicator of prognosis. *J Pathol.* 1999. 188(1):14-7.

**Fesik SW.** Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell.* 2000. 103(2):273-82.

**Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R.** The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 1993. 75(5):1027-38.

**Flood DM, Weiss NS, Cook LS, Emerson JC, Schwartz SM, Potter JD.** Colorectal cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants. *Cancer Causes Control.* 2000. 11(5):403-11.

**Flores-Rozas H, Clark D, Kolodner RD.** Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex. *Nat Genet.* 2000. 26(3):375-8.

**Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H.** Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 2001. 3(4):433-8.

**Fodor FH, Weston A, Bleiweiss IJ, McCurdy LD, Walsh MM, Tartter PI, Brower ST, Eng CM.** Frequency and carrier risk associated with common BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer patients. *Am J Hum Genet.* 1998. 63(1):45-51.

**Foulkes WD.** A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. *QJM.* 1995. 88(12):853-63.

**Franco A, Sikalidis AK, Solís Herruzo JA.** Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors. *Rev Esp Enferm Dig.* 2005. 97(6):432-48.

**Fuchs CS, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Speizer FE, Giovannucci EL.** The influence of folate and multivitamin use on the familial risk of colon cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002. 11(3):227-34.



**Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T.** Suppression of E-cadherin and alpha- and beta-catenin mRNA expression in the metastatic lesions of gynecological cancers. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1997. 18(6):484-7.

**Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman JR, Booker S, Lynch HT, Jass JR, Green JS, Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR.** Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 1998. 153(4):1063-78.

**Gardner EJ, Richards RC.** Multiple cutaneous and subcutaneous lesions occurring simultaneously with hereditary polyposis and osteomatosis. *Am J Hum Genet.* 1953. 5(2):139-47.

**Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, Tu HC, Kim H, Cheng EH, Tjandra N, Walensky LD.** BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature.* 2008. 455(7216):1076-81.

**Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, Hamelin R.** Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene.* 2001. 20(36):5025-32.

**Genschel J, Modrich P.** Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. *Mol Cell.* 2003. 12(5):1077-86.

**Gil J, Peters G.** Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006. 7(9):667-77.

**Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnoli MM, Boland CR.** Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 2003. 63(7):1608-14.

**Goh HS, Jass JR.** DNA content and the adenoma-carcinoma sequence in the colorectum. *J Clin Pathol.* 1986. 39(4):387-92.

**Goldstein AM.** Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Hum Mutat.* 2004. 23(6):630.

**Gómez-Domínguez E, Trapero-Marugán M, del Pozo AJ, Cantero J, Gisbert JP, Maté J.** The colorectal carcinoma prognosis factors. Significance of diagnosis delay. *Rev Esp Enferm Dig.* 2006. 98(5):322-9.

**González-Aguilera JJ, Herrero MP, Maillo C, Moreno-Azcoita M, Fernández-Peralta AM.** Loss of heterozygosity of TP53 is not correlated with clinicopathological variables in sporadic colorectal carcinomas. *Anticancer Res.* 1999. 19(2A):1325-9.

**González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernández-Peralta AM.** Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol.* 2004. 27(1):39-45.

**Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon K, Willis J, Markowitz S.** Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res.* 1998. 58(14):3101-4.

**Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ, Markowitz S.** Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet.* 2000. 26(1):16-7.

**Grady WM.** Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004. 23(1-2):11-27.

**Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB, Trougouboff P, Tomsho LD, Kim E, Low M, Almog R, Rennert G, Gruber SB.** Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol.* 2003. 27(5):563-70.

- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al.** Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991. 66(3):589-600.
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S.** Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000. 342(2):69-77.
- Guerrero S, Casanova I, Farré L, Mazo A, Capellà G, Manges R.** K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res*. 2000. 60(23):6750-6.
- Guerrette S, Acharya S, Fishel R.** The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Biol Chem*. 1999. 274(10):6336-41.
- Gumbiner BM.** Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*. 2000. 148(3):399-404.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA.** Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999. 400(6743):464-8.
- Halbleib JM, Nelson WJ.** Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev*. 2006. 20(23):3199-214.
- Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, et al.** The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*. 1995. 332(13):839-47.
- Hanahan D, Weinberg RA.** The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000. 100(1):57-70.
- Handra-Luca A, Condroyer C, de Moncuit C, Tepper M, Fléjou JF, Thomas G, Olschwang S.** Vessels' morphology in SMAD4 and BMPR1A-related juvenile polyposis. *Am J Med Genet A*. 2005. 138A(2):113-7.
- Harris CC.** Tumour suppressor genes, multistage carcinogenesis and molecular epidemiology. *IARC Sci Publ*. 1992. (116):67-85.
- Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T.** Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*. 1969. 223(5204):363-8.
- Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, Ward R.** CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2002. 122(5):1376-87.
- Her C, Doggett NA.** Cloning, structural characterization, and chromosomal localization of the human orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* MSH5 gene. *Genomics*. 1998. 52(1):50-61.
- Her C, Zhao N, Wu X, Tompkins JD.** MutS homologues hMSH4 and hMSH5: diverse functional implications in humans. *Front Biosci*. 2007. 12:905-11.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB.** Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996(a). 93(18):9821-6.
- Herman JG, Jen J, Merlo A, Baylin SB.** Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. *Cancer Res*. 1996(b). 56(4):722-7.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB.** Incidence and functional consequences of *MLH1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1998. 95(12):6870-5.
- Hirohashi S, Kanai Y.** Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. 2003. 94(7):575-81.

**Hoeijmakers JH.** Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001. 411(6835):366-74.

**Huang J, Papadopoulos N, McKinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, Zheng S, Willson JK, Markowitz SD, Morin P, Kinzler KW, Vogelstein B, Dunlop MG.** APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996. 93(17):9049-54.

**Hudler P, Vouk K, Liovic M, Repse S, Juvan R, Komel R.** Mutations in the hMLH1 gene in Slovenian patients with gastric carcinoma. *Clin Genet*. 2004. 65(5):405-11.

**Hutter P, Couturier A, Rey-Berthod C.** Two common forms of the human MLH1 gene may be associated with functional differences. *J Med Genet*. 2000. 37(10):776-81.

**Iacopetta B.** Are there two sides to colorectal cancer?. *Int J Cancer*. 2002. 101(5):403-8.

**Iacopetta BJ, Welch J, Soong R, House AK, Zhou XP, Hamelin R.** Mutation of the transforming growth factor-beta type II receptor gene in right-sided colorectal cancer: relationship to clinicopathological features and genetic alterations. *J Pathol*. 1998. 184(4):390-5.

**Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, Watanabe H.** DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol*. 1999. 52(1):5-9.

**Ikeda M, Orimo H, Moriyama H, Nakajima E, Matsubara N, Mibu R, Tanaka N, Shimada T, Kimura A, Shimizu K.** Close correlation between mutations of E2F4 and hMSH3 genes in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res*. 1998. 58(4):594-8.

**Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M.** Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993. 363(6429):558-61.

**Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, Reed JC, Perucho M.** Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 97(20):10872-7.

**Ishiguro A, Takahata T, Saito M, Yoshiya G, Tamura Y, Sasaki M, Munakata A.** Influence of methylated p15 and p16 genes on clinicopathological features in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006. 21(8):1334-9.

**Issa JP.** Epigenetic variation and human disease. *J Nutr*. 2002. 132(8 Suppl):2388S-2392S.

**Issa JP, Shen L, Toyota M.** CIMP, at last. *Gastroenterology*. 2005. 129(3):1121-4.

**Jacinto FV, Esteller M.** Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer. *Mutagenesis*. 2007. 22(4):247-53.

**Jacobs ET, Martínez ME, Alberts DS, Jiang R, Lance P, Lowe KA, Thompson PA.** Association between body size and colorectal adenoma recurrence. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007. 5(8):982-90.

**Jäger AC, Bisgaard ML, Myrholm T, Bernstein I, Rehfeld JF, Nielsen FC.** Reduced frequency of extracolonic cancers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families with monoallelic hMLH1 expression. *Am J Hum Genet*. 1997. 61(1):129-38.

**Jass JR.** Serrated adenoma and colorectal cancer. *J Pathol*. 1999(a). 187(5):499-502.

**Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J, Leggett BA.** Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol*. 1999(b). 52(6):455-60.

**Jass JR, Iino H, Ruszkiewicz A, Painter D, Solomon MJ, Koorey DJ, Cohn D, Furlong KL, Walsh MD, Palazzo J, Edmonston TB, Fishel R, Young J, Leggett BA.** Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut*. 2000. 47(1):43-9.

**Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA.** Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology*. 2002. 123(3):862-76.

**Jass JR.** Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007. 50(1):113-30.

**Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR.** Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1994. 331(4):213-21.

**Jiricny J.** Replication errors: cha(lle)nging the genome. *EMBO J*. 1998(a). 17(22):6427-36.

**Jiricny J.** Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutat Res*. 1998(b). 409(3):107-21.

**Jiricny J.** The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006. 7(5):335-46.

**Johannsdottir JT, Bergthorsson JT, Gretarsdottir S, Kristjansson AK, Ragnarsson G, Jonasson JG, Egilsson V, Ingvarsson S.** Replication error in colorectal carcinoma: association with loss of heterozygosity at mismatch repair loci and clinicopathological variables. *Anticancer Res*. 1999. 19(3A):1821-6.

**Jones PA, Laird PW.** Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999. 21(2):163-7.

**Jones PA, Baylin SB.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002. 3(6):415-28.

**Jones JS, Chi X, Gu X, Lynch PM, Amos CI, Frazier ML.** p53 polymorphism and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Caucasian population. *Clin Cancer Res*. 2004. 10(17):5845-9.

**Jung B, Smith EJ, Doctolero RT, Gervaz P, Alonso JC, Miyai K, Keku T, Sandler RS, Carethers JM.** Influence of target gene mutations on survival, stage and histology in sporadic microsatellite unstable colon cancers. *Int J Cancer*. 2006. 118(10):2509-13.

**Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, Ronai Z.** Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene*. 1991. 6(6):1079-83.

**Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR, Leggett BA.** BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*. 2004. 53(8):1137-44.

**Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R.** Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997. 57(5): 808-11.

**Kawamoto K, Enokida H, Gotanda T, Kubo H, Nishiyama K, Kawahara M, Nakagawa M.** p16INK4a and p14ARF methylation as a potential biomarker for human bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006. 339(3):790-6.

**Kaz A, Kim YH, Dzieciatkowski S, Lynch H, Watson P, Kay Washington M, Lin L, Grady WM.** Evidence for the role of aberrant DNA methylation in the pathogenesis of Lynch syndrome adenomas. *Int J Cancer*. 2007. 120(9):1922-9.

**Kemp Z, Thirlwell C, Sieber O, Silver A, Tomlinson I.** An update on the genetics of colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 2004. 13 Spec No 2:R177-85.

**Kim H, Kim YH, Kim SE, Kim NG, Noh SH, Kim H.** Concerted promoter hypermethylation of hMLH1, p16INK4A, and E-cadherin in gastric carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol*. 2003(a). 200(1):23-31.

**Kim HC, Kim CN, Yu CS, Roh SA, Kim JC.** Methylation of the hMLH1 and hMSH2 promoter in early-onset sporadic colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis*. 2003(b). 18(3):196-202.

**Kim JC, Koo KH, Roh SA, Cho YK, Kim HC, Yu CS, Kim HJ, Kim JS, Cho MK.** Genetic and epigenetic changes in the APC gene in sporadic colorectal carcinoma with synchronous adenoma. *Int J Colorectal Dis.* 2003(c). 18(3):203-9.

**Kim WY, Sharpless NE.** The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell.* 2006(b). 127(2):265-75.

**Kim YH, Petko Z, Dzieciatkowski S, Lin L, Ghiassi M, Stain S, Chapman WC, Washington MK, Willis J, Markowitz SD, Grady WM.** CpG island methylation of genes accumulates during the adenoma progression step of the multistep pathogenesis of colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006(a). 45(8):781-9.

**Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al.** Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science.* 1991. 253(5020):661-5.

**Kinzler KW, Vogelstein B.** Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996. 87(2):159-70.

**Kondo E, Horii A, Fukushima S.** The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucleic Acids Res.* 2001. 29(8):1695-702.

**Kondo Y, Issa JP.** Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004. 23(1-2):29-39.

**Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Tanaka K, Muraoka M, Onda A, Okumura Y, Kishi N, Iwama T, Mori T, Koike M, Ushio K, Chiba M, Nomizu S, Konishi F, Utsunomiya J, Miyaki M.** Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology.* 1996. 111(2):307-17.

**Knudson AG Jr.** Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971. 68(4):820-3.

**Knudson AG.** Cancer genetics. *Am J Med Genet.* 2002. 111(1):96-102.

**Knudsen AL, Bisgaard ML, Bülow S.** Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer.* 2003. 2(1):43-55.

**Kranenburg O.** The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta.* 2005. 1756(2):81-2.

**Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la chapelle A. and Peltomäki P.** Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am. J. Pathol.* 2000. 156: 1773-1779.

**Kunkel TA, Erie DA.** DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem.* 2005. 74:681-710.

**Laiho P, Launonen V, Lahermo P, Esteller M, Guo M, Herman JG, Mecklin JP, Järvinen H, Sistonen P, Kim KM, Shibata D, Houlston RS, Aaltonen LA.** Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res.* 2002. 62(4):1166-70.

**Laird P W.** The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* 2003. 3(4):253-66.

**Lamers MH, Perrakis A, Enzlin JH, Winterwerp HH, de Wind N, Sixma TK.** The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature.* 2000. 407(6805):711-7.

**Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, Clark S, Johnson V, Bell J, Frayling I, Efstathiou J, Pack K, Payne S, Roylance R, Gorman P, Sheer D, Neale K, Phillips R, Talbot I, Bodmer W, Tomlinson I.** The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med.* 1999. 5(9):1071-5.

**Lane DP, Crawford LV.** T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* 1979. 278(5701):261-3.

**Lane DP.** Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992. 358 (6381): 15-6.

**Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, et al.** Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 1993. 75(6):1215-25.

**Lee SD, Alani E.** Analysis of interactions between mismatch repair initiation factors and the replication processivity factor PCNA. *J Mol Biol*. 2006. 355(2):175-84.

**Lee S, Cho NY, Yoo EJ, Kim JH, Kang GH.** CpG island methylator phenotype in colorectal cancers: comparison of the new and classic CpG island methylator phenotype marker panels. *Arch Pathol Lab Med*. 2008. 132(10):1657-65.

**Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997(a). 94(6):2545-50.

**Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 1997(b). 386(6625):623-7.

**Levi F, Pasche C, La Vecchia C, Lucchini F, Franceschi S.** Food groups and colorectal cancer risk. *Br J Cancer*. 1999. 79(7-8):1283-7.

**Lim W, Hearle N, Shah B, Murday V, Hodgson SV, Lucassen A, Eccles D, Talbot I, Neale K, Lim AG, O'Donohue J, Donaldson A, Macdonald RC, Young ID, Robinson MH, Lee PW, Stoodley BJ, Tomlinson I, Alderson D, Holbrook AG, Vyas S, Swarbrick ET, Lewis AA, Phillips RK, Houlston RS.** Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *Br J Cancer*. 2003. 89(2):308-13.

**Lin KM, Shashidharan M, Ternent CA, Thorson AG, Blatchford GJ, Christensen MA, Lanspa SJ, Lemon SJ, Watson P, Lynch HT.** Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. *Dis Colon Rectum*. 1998. 41(4):428-33.

**Lin Z, Nei M, Ma H.** The origins and early evolution of DNA mismatch repair genes--multiple horizontal gene transfers and co-evolution. *Nucleic Acids Res*. 2007. 35(22):7591-603.

**Lindblom A.** Different mechanisms in the tumorigenesis of proximal and distal colon cancers. *Curr Opin Oncol*. 2001. 13(1):63-9.

**Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, Gallinger S, Bapat B, Aronson M, Hopper J, Jass J, LeMarchand L, Grove J, Potter J, Newcomb P, Terdiman JP, Conrad P, Moslein G, Goldberg R, Ziogas A, Anton-Culver H, de Andrade M, Siegmund K, Thibodeau SN, Boardman LA, Seminara D.** Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA*. 2005. 293(16):1979-85.

**Linzer DI, Levine AJ.** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979. 17(1):43-52.

**Lipkin SM, Rozek LS, Rennert G, Yang W, Chen PC, Hacia J, Hunt N, Shin B, Fodor S, Kokoris M, Greenson JK, Fearon E, Lynch H, Collins F, Gruber SB.** The MLH1 D132H variant is associated with susceptibility to sporadic colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004. 36(7):694-9.

**Listgarten J, Damaraju S, Poulin B, Cook L, Dufour J, Driga A, Mackey J, Wishart D, Greiner R, Zanke B.** Predictive models for breast cancer susceptibility from multiple single nucleotide polymorphisms. *Clin Cancer Res*. 2004. 10(8):2725-37.

**Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopoulos N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, et al.** Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet*. 1995. 9(1):48-55.

**Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW.** Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med*. 1996. 2(2):169-74.

**Liu L, Li Y, Tollefsbol TO.** Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases. *Curr Issues Mol Biol.* 2008. 10(1-2):25-36.

**Liu T, Tannergård P, Hackman P, Rubio C, Kressner U, Lindmark G, Hellgren D, Lambert B, Lindblom A.** Missense mutations in hMLH1 associated with colorectal cancer. *Hum Genet.* 1999. 105(5):437-41.

**Lockhart-Mummery JP.** Two hundred cases of cancer of the rectum treated by perineal excision: *Br J Surg.* 1926. 7(14): 110-124.

**Loeb LA, Springgate CF, Battula N.** Errors in DNA replication as a basis of malignant changes. *Cancer Res.* 1974. 34(9):2311-21.

**Loeb LA.** Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991. 51(12):3075-9.

**López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B.** Informe sobre la salud de los españoles. Cáncer. Información disponible a diciembre de 2003. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III.

**Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Järvinen H, Mecklin JP, Launonen V, Aaltonen LA.** Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res.* 2001. 61(11):4545-9.

**Lowy DR, Willumsen BM.** Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem.* 1993. 62:851-91.

**Lu SL, Akiyama Y, Nagasaki H, Saitoh K, Yuasa Y.** Mutations of the transforming growth factor-beta type II receptor gene and genomic instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995. 216(2):452-7.

**Lüchtenborg M, Weijenberg MP, Roemen GM, de Bruïne AP, van den Brandt PA, Lentjes MH, Brink M, van Engeland M, Goldbohm RA, de Goeij AF.** APC mutations in sporadic colorectal carcinomas from The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis.* 2004. 25(7):1219-26.

**Lynch HT, Krush AJ.** Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer.* 1971. 27(6):1505-11

**Lynch HT, Smyrk TC, Lanspa SJ, Lynch PM, Watson P, Strayhorn PC, Bronson EK, Lynch JF, Priluck IA, Appelman HD.** Phenotypic variation in colorectal adenoma/cancer expression in two families. Hereditary flat adenoma syndrome. *Cancer.* 1990. 66(5):909-15.

**Lynch HT, Lanspa S, Smyrk T, Boman B, Watson P, Lynch J.** Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history, and cancer control, Part I. *Cancer Genet Cytogenet.* 1991. 53(2):143-60.

**Lynch HT, de la Chapelle A.** Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 1999. 36(11):801-18.

**Lynch HT, Grady W, Lynch JF, Tsuchiya KD, Wiesner G, Markowitz SD.** E-cadherin mutation-based genetic counseling and hereditary diffuse gastric carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000. 122(1):1-6.

**Lynch HT, de la Chapelle A.** Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003. 348(10):919-32.

**Lynch HT, Coronel SM, Okimoto R, Hampel H, Sweet K, Lynch JF, Barrows A, Wijnen J, van der Klift H, Franken P, Wagner A, Fodde R, de la Chapelle A.** A founder mutation of the MSH2 gene and hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States. *JAMA.* 2004. 291(6):718-24.

**Lynch HT, Boland CR, Gong G, Shaw TG, Lynch PM, Fodde R, Lynch JF, de la Chapelle A.** Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet.* 2006. 14(4):390-402.



**Maeda K, Kawakami K, Ishida Y, Ishiguro K, Omura K, Watanabe G.** Hypermethylation of the CDKN2A gene in colorectal cancer is associated with shorter survival. *Oncol Rep.* 2003. 10(4):935-8.

**Mäkinen MJ.** Colorectal serrated adenocarcinoma. *Histopathology.* 2007. 50(1):131-50.

**Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M.** Frameshift mutator mutations. *Nature.* 1996. 382(6591):499-500.

**Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al.** Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science.* 1995. 268(5215):1336-8.

**Marra G, Iaccarino I, Lettieri T, Roscilli G, Delmastro P, Jiricny J.** Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95(15):8568-73.

**Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, Bodurtha J, Crowe C, Curtis MA, Dasouki M, Dunn T, Feit H, Geraghty MT, Graham JM Jr, Hodgson SV, Hunter A, Korf BR, Manchester D, Miesfeldt S, Murday VA, Nathanson KL, Parisi M, Pober B, Romano C, Eng C, et al.** PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum Mol Genet.* 1999. 8(8):1461-72.

**Martínez ME, Jacobs ET, Ashbeck EL, Sinha R, Lance P, Alberts DS, Thompson PA.** Meat intake, preparation methods, mutagens and colorectal adenoma recurrence. *Carcinogenesis.* 2007. 28(9):2019-27.

**Masciari S, Larsson N, Senz J, Boyd N, Kaurah P, Kandel MJ, Harris LN, Pinheiro HC, Troussard A, Miron P, Tung N, Oliveira C, Collins L, Schnitt S, Garber JE, Huntsman D.** Germline E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. *J Med Genet.* 2007. 44(11):726-31.

**Massagué J.** TGFbeta in Cancer. *Cell.* 2008. 134(2):215-30.

**Mathonnet G, Krajcinovic M, Labuda D, Sinnott D.** Role of DNA mismatch repair genetic polymorphisms in the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003. 123(1):45-8.

**Mátyás G, Arnold E, Carrel T, Baumgartner D, Boileau C, Berger W, Steinmann B.** Identification and in silico analyses of novel TGFBR1 and TGFBR2 mutations in Marfan syndrome-related disorders. *Hum Mutat.* 2006. 27(8):760-9.

**Mazelin L, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, Bredesen DE, Scoazec JY, Mehlen P.** Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature.* 2004. 431(7004):80-4.

**McCashland TM, Brand R, Lyden E, de Garmo P; CORI Research Project.** Gender differences in colorectal polyps and tumors. *Am J Gastroenterol.* 2001. 96(3):882-6.

**Medina-Arana V, Barrios Y, Fernández-Peralta A, Herrera M, China N, Lorenzo N, Jiménez A, Martín-López JV, González-Hermoso F, Salido E, González-Aguilera JJ.** New founding mutation in MSH2 associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome on the Island of Tenerife. *Cancer Lett.* 2006. 244(2):268-73.

**Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE.** The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature.* 1998. 395(6704):801-4.

**Mei Q, Yan HL, Ding FX, Xue G, Huang JJ, Wang YZ, Sun SH.** Single-nucleotide polymorphisms of mismatch repair genes in healthy Chinese individuals and sporadic colorectal cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006. 171(1):17-23.

**Mercurio MG, Shiff SJ, Galbraith RA, Sassa S.** Expression of cytochrome P450 mRNAs in the colon and the rectum in normal human subjects. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995. 210(2):350-5.



**Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, Dobles M, Sorger PK, Murty VV, Benezra R.** MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*. 2001. 409(6818):355-9.

**Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H.** Mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2002. 156(10):885-902.

**Mitselou A, Ioachim E, Peschos D, Charalabopoulos K, Michael M, Agnantis NJ, Vougiouklakis T.** E-cadherin adhesion molecule and syndecan-1 expression in various thyroid pathologies. *Exp Oncol*. 2007. 29(1):54-60.

**Miyake S, Nagai K, Yoshino K, Oto M, Endo M, Yuasa Y.** Point mutations and allelic deletion of tumor suppressor gene DCC in human esophageal squamous cell carcinomas and their relation to metastasis. *Cancer Res*. 1994. 54(11):3007-10.

**Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T.** Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*. 1997. 17(3):271-2.

**Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y, Nagai H.** Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2001. 121(6):1300-9.

**Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Fukayama N, Igarashi S, Kotake K, Matsui T, Koyama Y, Maekawa M, Nagai H.** Methylation profile of the MLH1 promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003. 36(1):17-25.

**Modrich P.** Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annu Rev Genet*. 1991. 25: 229-53.

**Modrich P, Lahue R.** Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*. 1996. 65:101-33.

**Modrich P.** Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem*. 2006. 281(41):30305-9.

**Mohd AB, Palama B, Nelson SE, Tomer G, Nguyen M, Huo X, Buermeyer AB.** Truncation of the C-terminus of human MLH1 blocks intracellular stabilization of PMS2 and disrupts DNA mismatch repair. *DNA Repair (Amst)*. 2006. 5(3):347-61.

**Mori Y, Yin J, Rashid A, Leggett BA, Young J, Simms L, Kuehl PM, Langenberg P, Meltzer SJ, Stine OC.** Instabilotyping: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res*. 2001. 61(16):6046-9.

**Mori Y, Selaru FM, Sato F, Yin J, Simms LA, Xu Y, Olaru A, Deacu E, Wang S, Taylor JM, Young J, Leggett B, Jass JR, Abraham JM, Shibata D, Meltzer SJ.** The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Res*. 2003. 63(15):4577-82.

**Moura Lima E, Ferreira Leal M, Cardoso Smith Mde A, Rodríguez Burbano R, Pimentel de Assumpção P, Bello MJ, Rey JA, Ferreira de Lima F, Casartelli C.** DNA mismatch repair gene methylation in gastric cancer in individuals from northern Brazil. *Biocell*. 2008. 32(3):237-43.

**Müller A, Zielinski D, Friedrichs N, Oberschmid B, Merkelbach-Bruse S, Schackert HK, Linnebacher M, von Knebel Doeberitz M, Büttner R, Rüschhoff J; German HNPCC Consortium, German Cancer Aid Deutsche Krebshilfe.** Reduced mRNA expression in paraffin-embedded tissue identifies MLH1- and MSH2-deficient colorectal tumours and potential mutation carriers. *Virchows Arch*. 2008. 453(1):9-16.

**Muto T, Bussey HJ, Morson BC.** The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. 1975. 36(6):2251-70.

**Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Orth K, Mathis M, Kinzler KW, Lutterbaugh J, Park K, et al.** A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res*. 1995. 55(23):5545-7.

- Nakata S, Sugio K, Uramoto H, Oyama T, Hanagiri T, Morita M, Yasumoto K.** The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. *Cancer*. 2006. 106(10):2190-9.
- Nascimbeni R, Di Fabio F, Di Betta E, Salerni B.** The changing impact of age on colorectal cancer surgery. A trend analysis. *Colorectal Dis*. 2009. 11(1):13-8.
- Nelson WJ, Nusse R.** Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004. 303(5663):1483-7.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF.** Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*. 1989. 17(7):2503-16.
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, et al.** Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 1994. 371(6492):75-80.
- Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P.** Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*. 1991. 253(5020):665-9.
- Nowell PC.** Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol*. 2002. 12(4):261-6.
- Numata S, Ueno S, Iga J, Yamauchi K, Hongwei S, Hashimoto R, Takeda M, Kunugi H, Itakura M, Ohmori T.** TGFB2 gene expression and genetic association with schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2008. 42(6):425-32.
- Nyström-Lahti M, Kristo P, Nicolaides NC, Chang SY, Aaltonen LA, Moisio AL, Järvinen HJ, Mecklin JP, Kinzler KW, Vogelstein B, et al.** Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer. *Nat Med*. 1995. 1(11):1203-6.
- Obmolova G, Ban C, Hsieh P, Yang W.** Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*. 2000. 407(6805):703-10.
- Obrand DI, Gordon PH.** Continued change in the distribution of colorectal carcinoma. *Br J Surg*. 1998. 85(2):246-8.
- Ogino S, Kawasaki T, Ogawa A, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS.** TGFB2 mutation is correlated with CpG island methylator phenotype in microsatellite instability-high colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2007. 38(4):614-20.
- Oh K, Redston M, Odze RD.** Support for hMLH1 and MGMT silencing as a mechanism of tumorigenesis in the hyperplastic-adenoma-carcinoma (serrated) carcinogenic pathway in the colon. *Hum Pathol*. 2005. 36(1):101-11.
- Okayama H, Curiel DT, Brantly ML, Holmes MD, Crystal RG.** Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. *J Lab Clin Med* 1989. 114:105-13.
- Okoń K, Demczuk S, Klimkowska A, Wójcik P, Osuch C, Papla B, Stachura J.** Correlation of microsatellite status, proliferation, apoptotic and selected immunohistochemical markers in colorectal carcinoma studied with tissue microarray. *Pol J Pathol*. 2006;57(2):105-11.
- Oliart S, Martínez-Santos C, Moreno-Azcoita M, Cerquella C, Nejda N, Daimiel L, Iglesias D, Fernández-Peralta AM, González-Aguilera JJ.** Do MSI-L sporadic colorectal tumors develop through "mild mutator pathway"? *Am J Clin Oncol*. 2006. 29(4):364-70.
- Oliveira C, Seruca R, Seixas M, Sobrinho-Simões M.** The clinicopathological features of gastric carcinomas with microsatellite instability may be mediated by mutations of different "target genes": a study of the TGFbeta RII, IGFII R, and BAX genes. *Am J Pathol*. 1998. 153(4):1211-9.

**Oliveira C, Bordin MC, Grehan N, Huntsman D, Suriano G, Machado JC, Kiviluoto T, Aaltonen L, Jackson CE, Seruca R, Caldas C.** Screening E-cadherin in gastric cancer families reveals germline mutations only in hereditary diffuse gastric cancer kindred. *Hum Mutat.* 2002. 19(5):510-7.

**Oliveira C, de Bruin J, Nabais S, Ligtenberg M, Moutinho C, Nagengast FM, Seruca R, van Krieken H, Carneiro F.** Intragenic deletion of CDH1 as the inactivating mechanism of the wild-type allele in an HDGC tumour. *Oncogene.* 2004. 23(12):2236-40.

**Olson RM, Perencevich NP, Malcolm AW, Chaffey JT, Wilson RE.** Patterns of recurrence following curative resection of adenocarcinoma of the colon and rectum. *Cancer.* 1980. 45(12):2969-74.

**OMS:** <http://www.who.int/es/>

**Ortega S, Malumbres M, Barbacid M.** Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002. 1602(1):73-87.

**Ouyang H, Shiwaku HO, Hagiwara H, Miura K, Abe T, Kato Y, Ohtani H, Shiiba K, Souza RF, Meltzer SJ, Horii A.** The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. *Cancer Res.* 1997. 57(10):1851-4.

**Paluszczak J, Baer-Dubowska W.** Epigenetic diagnostics of cancer--the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet.* 2006. 47(4):365-75.

**Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al.** Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science.* 1994. 263(5153):1625-9.

**Paquis-Flucklinger V, Santucci-Darmanin S, Paul R, Saunières A, Turc-Carel C, Desnuelle C.** Cloning and expression analysis of a meiosis-specific MutS homolog: the human MSH4 gene. *Genomics.* 1997. 44(2):188-94.

**Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P.** Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005. 55(2):74-108.

**Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P.** Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell.* 1993. 75(6):1227-36.

**Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B.** Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1995. 55(23):5548-50.

**Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkänen L, Nyström-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, et al.** Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.* 1993. 53(24):5853-5.

**Peltomäki P, Vasen HF.** Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 1997. 113(4):1146-58.

**Peltomäki P, Vasen H.** Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers.* 2004. 20(4-5):269-76.

**Peltomäki P.** Lynch syndrome genes. *Fam Cancer.* 2005. 4(3):227-32.

**Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E.** Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell.* 2003. 112(4):535-48.

**Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G.** A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature.* 1998. 392(6672):190-3.

**Perucho M, Peinado MA, Ionov Y, Casares S, Malkhosyan S, Stanbridge E.** Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994. 59:339-48.

**Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW.** Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004. 1644(2-3):83-94.

**Pharoah PD, Guilford P, Caldas C; International Gastric Cancer Linkage Consortium.** Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology.* 2001. 121(6):1348-53.

**Piard F, Martin L, Chapusot C, Ponnelle T, Faivre J.** [Genetic pathways in colorectal cancer: interest for the pathologist]. *Ann Pathol.* 2002. 22(4):277-88.

**Piñol V, Andreu M, Castells A, Payá A, Bessa X, Rodrigo J; Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association.** Frequency of hereditary non-polypoid colorectal cancer and other colorectal cancer familial forms in Spain: a multicentre, prospective, nationwide study. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004. 16(1):39-45.

**Plotz G, Raedle J, Spina A, Welsch C, Stallmach A, Zeuzem S, Schmidt C.** Evaluation of the MLH1 I219V alteration in DNA mismatch repair activity and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008. 14(5):605-11.

**Ponti G, Ponz de Leon M.** Muir-Torre syndrome. *Lancet Oncol.* 2005. 6(12):980-7.

**Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, Long TI, Thibodeau SN, Lindor N, Young J, Jenkins MA, Hopper JL, Baron JA, Buchanan D, Casey G, Levine AJ, Le Marchand L, Gallinger S, Bapat B, Potter JD, Newcomb PA, Haile RW, Laird PW; Colon Cancer Family Registry Investigators.** Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLH1 promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008. 17(11):3208-15.

**Pufulete M, Emery PW, Sanders TA.** Folate, DNA methylation and colo-rectal cancer. *Proc Nutr Soc.* 2003. 62(2):437-45.

**Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E.** Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol.* 2005. 26(1):12-7.

**Quirke P, Dixon MF, Day DW, Fozard JB, Talbot IC, Bird CC.** DNA aneuploidy and cell proliferation in familial adenomatous polyposis. *Gut.* 1988. 29(5):603-7.

**Quon KC, Berns A.** Haplo-insufficiency? Let me count the ways. *Genes Dev.* 2001. 15(22):2917-21.

**Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, Hampel H, Lynch E, Lönnqvist KE, Holinski-Feder E, Sutter C, McKinnon W, Duraisamy S, Gerdes AM, Peltomäki P, Kohonen-Ccorish M, Mangold E, Macrae F, Greenblatt M, de la Chapelle A, Nyström M.** Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology.* 2005. 129(2):537-49.

**Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M.** Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science.* 1997. 275(5302):967-9.

**Raptis S, Mrkonjic M, Green RC, Pethe VV, Monga N, Chan YM, Daftary D, Dicks E, Younghusband BH, Parfrey PS, Gallinger SS, McLaughlin JR, Knight JA, Bapat B.** MLH1 -93G>A promoter polymorphism and the risk of microsatellite-unstable colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007. 99(6):463-74.

**Räschle M, Marra G, Nyström-Lahti M, Schär P, Jiricny J.** Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem.* 1999. 274(45):32368-75.

**Raut CP, Pawlik TM, Rodriguez-Bigas MA.** Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res.* 2004. 568(2):275-82.

**Rehberg M, Gräf R.** Dictyostelium EB1 is a genuine centrosomal component required for proper spindle formation. *Mol Biol Cell*. 2002. 13(7):2301-10.

**Ren XR, Ming GL, Xie Y, Hong Y, Sun DM, Zhao ZQ, Feng Z, Wang Q, Shim S, Chen ZF, Song HJ, Mei L, Xiong WC.** Focal adhesion kinase in netrin-1 signaling. *Nat Neurosci*. 2004. 7(11):1204-12.

**Renan MJ.** How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Molecular carcinogenesis*. 1993. 7(3):139-46.

**Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ.** Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene*. 1994. 9(1):29-32.

**Riboli E, Norat T.** Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr*. 2003. 78(3 Suppl):559S-569S.

**Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J.** Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res*. 1993. 53(21):5100-3.

**Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Boyd J.** Mutations of the E-cadherin gene in human gynecologic cancers. *Nat Genet*. 1994. 7(1):98-102.

**Risinger JI, Barrett JC, Watson P, Lynch HT, Boyd J.** Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer*. 1996. 77(9):1836-43.

**Roa JC, Anabalón L, Tapia O, Martínez J, Araya JC, Villaseca M, Guzmán P, Roa I.** [Promoter methylation profile in breast cancer]. *Rev Med Chil*. 2004. 132(9):1069-77.

**Robertson K D.** DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005. 6(8):597-610.

**Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S.** A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997. 89(23):1758-62.

**Roh SA, Kim HC, Kim JS, Kim JC.** Characterization of mutator pathway in younger-age-onset colorectal adenocarcinomas. *J Korean Med Sci*. 2003. 18(3):387-91.

**Rous P.** Landmark article (JAMA 1911;56:198). Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. By Peyton Rous. *JAMA*. 1983. 250(11):1445-9.

**Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP.** APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 97(7):3352-7.

**Rowan A, Halford S, Gaasenbeek M, Kemp Z, Sieber O, Volikos E, Douglas E, Fiegler H, Carter N, Talbot I, Silver A, Tomlinson I.** Refining molecular analysis in the pathways of colorectal carcinogenesis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005. 3(11):1115-23.

**Royds JA, Iacopetta B.** p53 and disease: When the guardian angel fails. *Cell Death and differentiation*. 2006. (13): 1017-1026.

**Ruas M, Peters G.** The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*. 1998. 1378(2):F115-77.

**Rudzki Z, Zazula M, Okoń K, Stachura J.** Low-level microsatellite instability colorectal carcinomas: do they really belong to a "gray zone" between high-level microsatellite instability and microsatellite-stable cancers? *Int J Colorectal Dis*. 2003. 18(3):216-21.

**Russo A, Bazan V, Agnese V, Rodolico V, Gebbia N.** Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and TP53CRC collaborative studies. *Ann Oncol*. 2005(a). 16 Suppl 4:iv44-49.

**Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia N; TP53-CRC Collaborative Study Group.** The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2005**(b)**. 23(30):7518-28.

**Rustgi AK.** Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med.* 1994. 331(25):1694-702.

**Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Iversen OE, Jacobs IJ, Akslen LA, Das S.** Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000. 6(9):3607-13.

**Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, Slattery ML.** Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001**(a)**. 10(9):917-23.

**Samowitz WS, Holden JA, Curtin K, Edwards SL, Walker AR, Lin HA, Robertson MA, Nichols MF, Gruenthal KM, Lynch BJ, Leppert MF, Slattery ML.** Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am J Pathol.* 2001**(b)**. 158(4):1517-24.

**Samowitz WS, Curtin K, Neuhausen S, Schaffer D, Slattery ML.** Prognostic implications of BAX and TGFBR2 mutations in colon cancers with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002. 35(4):368-71.

**Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, Wolff RK, Slattery ML.** Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology.* 2005. 129(3):837-45.

**Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, Frayling I, Jordan S, Maher ER, Mak T, Maynard J, Pigatto F, Shaw J, Cheadle JP.** Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet.* 2003. 362(9377):39-41.

**Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE.** Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer.* 2008. 60(2):131-44.

**Scartozzi M, Bianchi F, Rosati S, Galizia E, Antolini A, Loretelli C, Piga A, Bearzi I, Cellerino R, Porfiri E.** Mutations of hMLH1 and hMSH2 in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: correlation with microsatellite instability and abnormalities of mismatch repair protein expression. *J Clin Oncol.* 2002. 20(5):1203-8.

**Schafmayer C, Buch S, Egberts JH, Franke A, Brosch M, El Sharawy A, Conring M, Koschnick M, Schwiedernoch S, Katalinic A, Kremer B, Fölsch UR, Krawczak M, Fändrich F, Schreiber S, Tepel J, Hampe J.** Genetic investigation of DNA-repair pathway genes PMS2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, OGG1 and MTH1 in sporadic colon cancer. *Int J Cancer.* 2007. 121(3):555-8.

**Schneider-Stock R, Boltze C, Peters B, Höpfner T, Meyer F, Lippert H, Roessner A.** Differences in loss of p16INK4 protein expression by promoter methylation between left- and right-sided primary colorectal carcinomas. *Int J Oncol.* 2003. 23(4):1009-13.

**Seidel C, Bartel F, Rastetter M, Bluemke K, Wurl P, Taubert H, Dammann R.** Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma. *Int J Cancer.* 2005. 114(3):442-7.

**Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, Lindblom A, Lagerstedt K, Thibodeau SN, Lindor NM, Young J, Winship I, Dowty JG, White DM, Hopper JL, Baglietto L, Jenkins MA, de la Chapelle A.** The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology.* 2008. 135(2):419-28.

**SEOM:** <http://www.seom.org/seomcms/index.php>

**Shen KL, Yang LS, Hsieh HF, Chen CJ, Yu JC, Tsai NM, Harn HJ.** Microsatellite alterations on human chromosome 11 in in situ and invasive breast cancer: a microdissection microsatellite analysis and correlation with p53, ER (estrogen receptor), and PR (progesterone receptor) protein immunoreactivity. *J Surg Oncol.* 2000. 74(2):100-7.

**Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G Jr, Jessup JM, Loda M, Summerhayes IC.** The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1996. 335(23):1727-32.

**Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001. 61(3):818-22.

**Shimamoto T, Ohyashiki JH, Hirano T, Kato H, Ohyashiki K.** Hypermethylation of E-cadherin gene is frequent and independent of p16INK4A methylation in non-small cell lung cancer: potential prognostic implication. *Oncol Rep.* 2004. 12(2):389-95.

**Shin BY, Chen H, Rozek LS, Paxton L, Peel DJ, Anton-Culver H, Rennert G, Mutch DG, Goodfellow PJ, Gruber SB, Lipkin SM.** Low allele frequency of MLH1 D132H in American colorectal and endometrial cancer patients. *Dis Colon Rectum.* 2005. 48(9):1723-7.

**Shin KH, Park YJ, Park JG.** Mutational analysis of the transforming growth factor beta receptor type II gene in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early-onset colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000. 6(2):536-40.

**Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinimann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, Thomas HJ, Tomlinson IP.** Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med.* 2003. 348(9):791-9.

**Simpkins SB, Bocker T, Swisher EM, Mutch DG, Gersell DJ, Kovatich AJ, Palazzo JP, Fishel R, Goodfellow PJ.** MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet.* 1999. 8(4):661-6.

**Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR.** Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. 99(14):9433-8.

**Snowden T, Acharya S, Butz C, Berardini M, Fishel R.** hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell.* 2004. 15(3):437-51.

**Solera J.A, Tárraga López P.J, Carbayo Herencia J.A, López Cara M.A, Celada Rodríguez A, Cerdán Oliver M, Ocaña López J.M.** Influence of diet and lifestyle in colorectal cancer. *REV ESP ENFERM DIG (Madrid).* 2007. 99(4):190-200.

**Söreide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JP.** Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg.* 2006. 93(4):395-406

**Sotamaa K, Liyanarachchi S, Mecklin JP, Järvinen H, Aaltonen LA, Peltomäki P, de la Chapelle A.** p53 codon 72 and MDM2 SNP309 polymorphisms and age of colorectal cancer onset in Lynch syndrome. *Clin Cancer Res.* 2005. 11(19 Pt 1):6840-4.

**Soussi T, Bérout C.** Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2001. 1(3):233-40.

**Spigelman AD, Murday V, Phillips RK.** Cancer and the Peutz-Jeghers syndrome. *Gut.* 1989. 30(11):1588-90.

**Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK.** DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature.* 1976. 260(5547):170-3.

**Stewart BW, Kleihus P.** World Cancer Report. Lyon: IARC Press. 2003.

**Svrcek M, Cosnes J, Beaugerie L, Parc R, Bennis M, Tiret E, Fléjou JF.** Colorectal neoplasia in Crohn's colitis: a retrospective comparative study with ulcerative colitis. *Histopathology*. 2007. 50(5):574-83.

**Talseth BA, Meldrum C, Suchy J, Kurzawski G, Lubinski J, Scott RJ.** MDM2 SNP309 T>G alone or in combination with the TP53 R72P polymorphism does not appear to influence disease expression and age of diagnosis of colorectal cancer in HNPCC patients. *Int J Cancer*. 2007. 120(3):563-5.

**Tanaka S, Mori M, Mafune K, Ohno S, Sugimachi K.** A dominant negative mutation of transforming growth factor-beta receptor type II gene in microsatellite stable oesophageal carcinoma. *Br J Cancer*. 2000. 82(9):1557-60.

**Tannergård P, Lipford JR, Kolodner R, Frödin JE, Nordenskjöld M, Lindblom A.** Mutation screening in the hMLH1 gene in Swedish hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res*. 1995. 55(24):6092-6.

**Tarafa G, Villanueva A, Farré L, Rodríguez J, Musulén E, Reyes G, Seminago R, Olmedo E, Paules AB, Peinado MA, Bachs O, Capellá G.** DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. *Oncogene*. 2000. 19(4):546-55.

**ten Dijke P, Hill CS.** New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*. 2004. 29(5):265-73.

**Terry P, Jain M, Miller AB, Howe GR, Rohan TE.** Dietary intake of folic acid and colorectal cancer risk in a cohort of women. *Int J Cancer*. 2002. 97(6):864-7.

**Thibodeau SN, Bren G, Schaid D.** Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993. 260(5109):816-9.

**Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV, Farr GH Jr, O'Connell MJ.** Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res*. 1998. 58(8):1713-8.

**Thomas LA, Veysey MJ, French G, Hylemon PB, Murphy GM, Dowling RH.** Bile acid metabolism by fresh human colonic contents: a comparison of caecal versus faecal samples. *Gut*. 2001. 49(6):835-42.

**Tighe A, Johnson VL, Taylor SS.** Truncating APC mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability. *J Cell Sci*. 2004. 117(Pt 26):6339-53.

**Tomlinson I, Ilyas M, Johnson V, Davies A, Clark G, Talbot I, Bodmer W.** A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer. *J Pathol*. 1998. 184(2):148-52.

**Tomlinson I, Halford S, Aaltonen L, Hawkins N, Ward R.** Does MSI-low exist? *J Pathol*. 2002. 197(1):6-13.

**Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF.** The mutation rate and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996(a). 93(25):14800-3.

**Tomlinson IP, Ilyas M, Bodmer WF.** Allele loss occurs frequently at hMLH1, but rarely at hMSH2, in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer*. 1996(b). 74(10):1514-7.

**Tournier I, Raux G, Di Fiore F, Maréchal I, Leclerc C, Martin C, Wang Q, Buisine MP, Stoppa-Lyonnet D, Olschwang S, Frébourg T, Tosi M.** Analysis of the allele-specific expression of the mismatch repair gene MLH1 using a simple DHPLC-Based Method. *Hum Mutat*. 2004. 23(4):379-84.

**Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP.** CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96(15):8681-6.

**Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP.** Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 97(2):710-5.

**Trimarchi JM, Lees JA.** Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. 3(1):11-20.



**Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, Plotz G, Jiricny J, Marra G.** Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology*. 2002. 122(1):211-9.

**Trojan J, Brieger A, Raedle J, Weber N, Kriener S, Kronenberger B, Caspary WF, Zeuzem S.** BAX and caspase-5 frameshift mutations and spontaneous apoptosis in colorectal cancer with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis*. 2004. 19(6):538-44.

**Tsao SW, Liu Y, Wang X, Yuen PW, Leung SY, Yuen ST, Pan J, Nicholls JM, Cheung AL, Wong YC.** The association of E-cadherin expression and the methylation status of the E-cadherin gene in nasopharyngeal carcinoma cells. *Eur J Cancer*. 2003. 39(4):524-31.

**Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, Nakahara Y, Saito H, Hotta T, Murate T.** Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997. 90(4):1403-9.

**Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA.** Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell*. 1996. 87(1):65-73.

**Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S.** Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004. 96(4):261-8.

**Vainio H, Kaaks R, Bianchini F.** Weight control and physical activity in cancer prevention: international evaluation of the evidence. *Eur J Cancer Prev*. 2002. 11 Suppl 2:S94-100.

**van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B.** Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut*. 2002. 51(6):797-802.

**Vasen HF, Mecklin JP, Meera Khan P, et al.** The International Collaborative Group on Hereditary Non-Poliposis Colorectal Cancer (IGC-HNPCC). *Dis Colon Rectum*. 1991. 34: 424-25.

**Vasen HF, Watson, Mecklin JP, et al.** New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome). Proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999. 116: 1453-56.

**Vasen HF, Morreau H, Nortier JW.** Is breast cancer part of the tumor spectrum of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Am J Hum Genet*. 2001. 68(6):1533-5.

**Vasen HF, Boland CR.** Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome. *JAMA*. 2005. 293(16):2028-30.

**Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD.** Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95(15):8698-702.

**Viñes JJ, Ardanaz E, Arrazola A, Gaminde I.** Epidemiología poblacional de cáncer colorrectal: revisión de la causalidad. *SALUD PÚBLICA Y ADMINISTRACIÓN SANITARIA. ANALES Sis San Navarra* 2003. 26(1).

**Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G.** Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2003. 105(1):41-6.

**Vogelstein B, Lane D, Levine AJ.** Surfing the p53 network. *Nature*. 2000. 408(6810):307-10.

**Vogelstein B, Kinzler KW.** Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004. 10(8):789-99.

**Vousden KH, Lane DP.** p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007. 8(4):275-83.

**Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N.** Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001. 48(6):821-9.

**Warthin AS.** Heredity with reference to carcinoma. *Arch Intern Med* 1913. 12:546-55.

**Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Hamilton SR.** Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2001. 344(16):1196-206.

**Watson P, Lynch HT.** Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1993. 71(3):677-85.

**Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ.** Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001. 292(5517):727-30.

**Weinberg DS, Newschaffer CJ, Topham A.** Risk for colorectal cancer after gynecologic cancer. *Ann Intern Med*. 1999. 131(3):189-93.

**Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW.** CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006. 38(7):787-93.

**Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF.** Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 96(18):10296-301.

**Wheeler JM, Kim HC, Efsthathiou JA, Ilyas M, Mortensen NJ, Bodmer WF.** Hypermethylation of the promoter region of the E-cadherin gene (CDH1) in sporadic and ulcerative colitis associated colorectal cancer. *Gut*. 2001. 48(3):367-71.

**Wiencke JK, Zheng S, Lafuente A, Lafuente MJ, Grudzen C, Wrensch MR, Miike R, Ballesta A, Trias M.** Aberrant methylation of p16INK4a in anatomic and gender-specific subtypes of sporadic colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999. 8(6):501-6.

**Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Møller P, Stormorken A, Meijers-Heijboer H, Lindhout D, Menko F, Vossen S, Möslein G, Tops C, Bröcker-Vriends A, Wu Y, Hofstra R, Sijmons R, Cornelisse C, Morreau H, Fodde R.** Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet*. 1999. 23(2):142-4.

**Willecke K, Schäfer R.** Human oncogenes. *Hum Genet*. 1984. 66(2-3):132-42.

**Wood DA, Robbins GF, Zippin C, Lum D, Stearns M.** Staging of cancer of the colon and cancer of the rectum. *Cancer*. 1979. 43(3):961-8.

**Wright CM, Dent OF, Barker M, Newland RC, Chapuis PH, Bokey EL, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Macdonald GA.** Prognostic significance of extensive microsatellite instability in sporadic clinicopathological stage C colorectal cancer. *Br J Surg*. 2000. 87(9):1197-202.

**Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, Kempinga C, Sijmons RH, van Der Zee AG, Hollema H, Kleibeuker JH, Buys CH, Hofstra RM.** Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet*. 1999. 65(5):1291-8.

**Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Chang MC, Sheu JC, Lin JT.** Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000. 27(4):403-11.

**Xu XL, Yu J, Zhang HY, Sun MH, Gu J, Du X, Shi DR, Wang P, Yang ZH, Zhu JD.** Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004. 10(23):3441-54.

**Yamaguchi T, Iijima T, Mori T, Takahashi K, Matsumoto H, Miyamoto H, Hishima T, Miyaki M.** Accumulation profile of frameshift mutations during development and progression of colorectal cancer from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 2006. 49(3):399-406.

**Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, Perucho M.** Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell*. 2003. 4(2):121-31.

**Yao T, Kouzuki T, Kajiwara M, Matsui N, Oya M, Tsuneyoshi M.** 'Serrated' adenoma of the colorectum, with reference to its gastric differentiation and its malignant potential. *J Pathol*. 1999. 187(5):511-7.

**Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fåhræus R.** p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol*. 2002. 4(6):462-7.

**Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, George J, Goldblatt J, Walpole I, Robin SA, Borten MM, Stitz R, Searle J, McKeone D, Fraser L, Purdie DR, Podger K, Price R, Buttenshaw R, Walsh MD, Barker M, Leggett BA, Jass JR.** Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2001. 159(6):2107-16.

**Young J, Barker MA, Simms LA, Walsh MD, Biden KG, Buchanan D, Buttenshaw R, Whitehall VL, Arnold S, Jackson L, Kambara T, Spring KJ, Jenkins MA, Walker GJ, Hopper JL, Leggett BA, Jass JR.** Evidence for BRAF mutation and variable levels of microsatellite instability in a syndrome of familial colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005. 3(3):254-63.

**Yu JH, Bigler J, Whitton J, Potter JD, Ulrich CM.** Mismatch repair polymorphisms and colorectal polyps: hMLH1-93G>A variant modifies risk associated with smoking. *Am J Gastroenterol*. 2006. 101(6):1313-9.

**Yuen ST, Chan TL, Ho JW, Chan AS, Chung LP, Lam PW, Tse CW, Wyllie AH, Leung SY.** Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene*. 2002. 21(49):7585-92.

**Zampino MG, Labianca R, Beretta G, Gatta G, Lorrizo K, Braud Fd F, Wils J.** Rectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004. 51(2):121-43.

**Zauber NP, Sabbath-Solitare M, Marotta SP, Bishop DT.** K-ras mutation and loss of heterozygosity of the adenomatous polyposis coli gene in patients with colorectal adenomas with in situ carcinoma. *Cancer*. 1999. 86(1):31-6.